



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Análisis genómico de plásmidos de *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ510 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506 aislados de una zona minera de Cerro de Pasco - Perú**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Doctora en Ciencias

Biológicas

**AUTOR**

Mg. Ruth Hortensia GARCÍA DE LA GUARDA

**ASESOR**

Dr. Pablo Sergio RAMÍREZ ROCA

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

García, R. (2021). *Análisis genómico de plásmidos de Acidithiobacillus ferrivorans PQ510 y Acidithiobacillus ferrooxidans PQ506 aislados de una zona minera de Cerro de Pasco - Perú*. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---

## Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	<a href="https://orcid.org/0000-0003-4801-5642">https://orcid.org/0000-0003-4801-5642</a>
DNI o pasaporte del autor	06041081
Código ORCID del asesor	<a href="https://orcid.org/0000-0001-9309-7021">https://orcid.org/0000-0001-9309-7021</a>
DNI o pasaporte del asesor	06183797
Grupo de investigación	Genómica funcional de microorganismos y biorremediación - MICROGEN
Agencia financiadora	<p>1) Perú Ministerio de la Producción. Programa financiero: Innóvate Perú Contrato-188-IB-FINCyT-2013</p> <p>2) Perú Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. UNMSM-VRIP. Programa Multidisciplinario de Investigación. Código PMI2016F02</p> <p>3) Perú Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. UNMSM-VRIP. Promoción de Tesis de Posgrado-Doctorado. Código B17100016a</p>
Ubicación geográfica donde se realizó la investigación	<p>Perú, Lima, Lima, Lima, UNMSM. Latitud: -11.85 Longitud: -76.45 Latitud S: 11° 50' 59.017" Longitud O: 76° 26' 59.806"</p>
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2016-2019
Disciplinas OCDE	<p>Bioquímica, Biología molecular</p> <p><a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03</a></p>



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 051v-UPG-FCB-2020

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (SUSTENTACIÓN VIRTUAL)**

Siendo las 15:00 horas del día 03 de mayo de 2021, en Evento Virtual mediante la herramienta MEET de Google, con enlace [meet.google.com/mrz-bsrs-wdc](https://meet.google.com/mrz-bsrs-wdc), el Jurado de Tesis conformado por:

Dra. Susana Mónica Gutiérrez Moreno	(Presidente)
Dra. Egma Marcelina Mayta Huatuco	(Miembro)
Dra. Martha Esther Valdivia Cuya	(Miembro)
Dr. Pablo Sergio Ramírez Roca	(Asesor)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas, que solicitara la señora Magíster Doña **RUTH HORTENSIA GARCÍA DE LA GUARDA**.

Después de darse lectura al **Expediente N° 051v-UPG-FCB-2020**, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado presenciaron la exposición de la Tesis Titulada:

**“ANÁLISIS GENÓMICO DE PLÁSMIDOS DE *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ510 Y *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506 AISLADOS DE UNA ZONA MINERA DE CERRO DE PASCO - PERÚ**”, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

### UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: EXCELENTE CON LA NOTA DE 19.

A continuación, la Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, a la señora Magíster **RUTH HORTENSIA GARCÍA DE LA GUARDA**.

Siendo las 17:40. se levantó la Sesión, recibiendo la graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, el día lunes 03 del mes de mayo del año 2021.



Firmado digitalmente por GUTIERREZ  
MORENO Susana Monica FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 03.05.2021 17:55:19 -05:00

**Dra. Susana M. Gutiérrez Moreno**  
Profesora Principal a T.C.  
PRESIDENTE

[sgutierrezm@unmsm.edu.pe](mailto:sgutierrezm@unmsm.edu.pe)  
RENACYT P0003854



Firmado digitalmente por RAMIREZ  
ROCA Pablo Sergio FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 03.05.2021 21:07:12 -05:00

**Dr. Pablo S. Ramírez Roca**  
Profesor Principal D.E.  
ASESOR

[pramirezr@unmsm.edu.pe](mailto:pramirezr@unmsm.edu.pe)  
RENACYT P0001952



Firmado digitalmente por MAYTA  
HUATUCO Egma Marcelina FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 03.05.2021 19:48:23 -05:00

**Dra. Egma M. Mayta Huatuco**  
Profesora Principal a D.E.  
MIEMBRO

[emaytah@unmsm.edu.pe](mailto:emaytah@unmsm.edu.pe)  
RENACYT P0013460



Firmado digitalmente por VALDIVIA  
CUYA Martha Esther FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 03.05.2021 19:24:24 -05:00

**Dra. Martha E. Valdivia Cuya**  
Profesora Principal a T.C.  
MIEMBRO

[mvaldiviac@unmsm.edu.pe](mailto:mvaldiviac@unmsm.edu.pe)  
RENACYT P0000017

## FINANCIAMIENTO

Esta tesis ha sido financiada por los siguientes proyectos:

- ✓ Innóvate Perú, titulado “Biolixiviación de minerales por microorganismos acidófilos psicotolerantes aislados de zonas mineras altoandinas del Perú para su aplicación en procesos industriales”, con Contrato-188-IB-FINCyT-2013, siendo Coordinador General e Investigador Principal el Dr. Pablo Sergio Ramírez Roca.
- ✓ Multidisciplinario de la UNMSM, titulado “Caracterización de plásmidos de cepas de *Acidithiobacillus ferrivorans* aislados de zonas mineras del Perú con potencial uso en biorremediación”, con Código PMI2016F02, bajo la responsabilidad de Mg. Ruth Hortensia García de la Guarda.
- ✓ Promoción de Tesis de Posgrado Doctorado, titulado “Análisis genómico de plásmidos de *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ510 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506 aislados de una zona minera de Cerro de Pasco – Perú”, con código B17100016a, bajo la asesoría del Dr. Pablo Sergio Ramírez Roca.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi asesor y amigo, Pablo Ramírez Roca, por invitarme a participar en sus proyectos de investigación y financiar la presente Tesis, sin lo cual no habría sido posible cumplir con esta meta tan importante para mí. Asimismo, le agradezco por su siempre acertada orientación en el tema de la tesis, su exigencia y por enseñarme a perseverar y tener constancia.

A los miembros del jurado por sus acertadas correcciones y recomendaciones.

Agradezco a mi colega y amiga Débora Alvarado Iparraguirre por su sabiduría en los consejos que dá, sus inteligentes y amenas conversaciones y por darse el tiempo de brindarme sus opiniones para mejorar.

A todos los ayudantes y tesistas del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, por estar siempre prestos a apoyar en lo que era necesario, especialmente a Anika Eca, Ivette Fuentes y Gustavo Mormontoy, por ayudarme con la purificación de los plásmidos y su envío a secuenciar. A Miguel Cervantes por tener la paciencia, voluntad y buena disposición para atender mis dudas y preguntas sobre bioinformática. A Michel Abanto Marín por revisar el secuenciamiento de los plásmidos y brindarme valiosas enseñanzas y consejos. A Luis Solís por su valiosa ayuda en la preparación de las prácticas y avance de mis proyectos, dándome más tiempo para dedicarle a la tesis. A todas y todos mis amigos que de una u otra manera me han estimulado para avanzar con la tesis.

Y a mi familia, David y Gilberto, lo que más amo en el mundo, por su paciencia, comprensión, aliento y apoyo en todo lo que he necesitado para poder cumplir con esta meta, postergada por varios años.



## DEDICATORIA

*A mis padres, Ruth y Rómulo, siempre presentes en mi mente, por haber dedicado su vida a darme amor, educación y bienestar.*

*A mi hijo, David, por su amor incondicional y la sabiduría, a pesar de su corta edad, para tolerar mis ausencias en casa, alentarme y animarme constantemente a alcanzar esta meta*

*A mi esposo, Gilberto, por darme siempre su apoyo, aliento y compañía*

*A mi querida maestra, colega y amiga Dra. Juana María Coha Gonzáles, por conducirme hacia la investigación y por enseñarme que la biología molecular era el camino a seguir en el campo de la microbiología. Siempre la tendré presente.*

*Al Dr. Alejandro Venegas Esparza, quien fue mi asesor de tesis de maestría en la Pontificia Universidad Católica de Chile allá por 1995-1998, y quien me enseñó el ABC de la biología molecular como el gran maestro y mejor persona que fue.*

## CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	Pág. VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Biominería	4
2.1.1. Biolixiviación	4
2.1.2. Biorremediación de ambientes contaminados con metales	6
2.2. Diversidad microbiana en hábitats de drenajes ácidos de minas	7
2.2.1. <i>Acidithiobacillus</i>	9
2.2.1.1. <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	10
2.2.1.2. <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	11
2.3. Plásmidos	12
2.3.1. Plásmidos de <i>Acidithiobacillus</i>	13
2.3.1.1. Genes de resistencia a metales en plásmidos	16
a) Operón <i>ars</i>	16
b) Operón <i>mer</i>	18
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
3.1. Hipótesis	19
3.2. Objetivos	19
3.2.1. Objetivo general	19
3.2.2. Objetivos específicos	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1. Cepas de <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> PQ510 y <i>At. ferrooxidans</i> PQ506	20
4.2. Aislamiento de plásmidos de <i>Acidithiobacillus</i>	20
4.3. Secuenciamiento y análisis bioinformático	21
4.3.1. Evaluación de la calidad de las secuencias	21
4.3.2. Ensamblaje de las secuencias	21
4.3.3. Anotación de las secuencias	22
4.3.4. Mapa circular de los plásmidos	23
4.3.5. Análisis del %GC de los plásmidos	23
4.3.6. Análisis comparativo del operón <i>arsADCRB</i>	24
4.3.7. Búsqueda de elementos genéticos móviles	25
5. RESULTADOS	26
5.1. Análisis bioinformático de los plásmidos pAfPQ510-1, pAfPQ510-2 y pAfPQ510-3 de <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> PQ510	26

5.1.1	Anotación de los plásmidos pAfPQ510-1, pAfPQ510-2 y pAfPQ510-3 de <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> PQ510	28
5.2	Análisis bioinformático del plásmido pAfPQ506-1 de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> PQ506	36
5.2.1	Anotación del plásmido pAfPQ506-1 de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> PQ506	38
5.2.2	Análisis comparativo del operón <i>arsADCRB</i>	41
5.2.3	Análisis filogenético de los plásmidos y del gen <i>arsC</i>	46
5.2.4	Análisis comparativo entre los plásmidos más relacionados	51
6.	DISCUSIÓN	55
6.1	Caracterización molecular y genómica de los plásmidos de <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> PQ510	55
6.2	Caracterización molecular y genómica del plásmido de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> PQ506	75
6.2.1	Análisis genómico comparativo de los genes de resistencia al arsénico <i>ars</i>	93
6.2.2	Análisis filogenético de plásmidos de bacterias ambientales con énfasis en las procedentes de ambientes mineros	97
7.	CONCLUSIONES	99
8.	RECOMENDACIONES	101
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
10.	ANEXOS	128

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1	5
Fig. 2	11
Fig. 3	16
Fig. 4	26
Fig. 5	33
Fig. 6	34
Fig. 7	35
Fig. 8	36
Fig. 9	37
Fig. 10	40
Fig. 11	42
Fig. 12	45
Fig. 13	48
Fig. 14	49
Fig. 15	50
Fig. 16	52
Fig. 17	53
Fig. 18	54
Fig. 19	87
Fig. 20	94

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1	Filogenia de microorganismos acidofílicos oxidantes de sulfuros metálicos. 8
Tabla 2	Características generales del plásmido pAfPQ510-1. 27
Tabla 3	Características generales del plásmido pAfPQ510-2. 27
Tabla 4	Características generales del plásmido pAfPQ510-3. 27
Tabla 5	Secuencias codificantes encontradas en el plásmido pAfPQ510-1. 28
Tabla 6	Secuencias codificantes encontradas en el plásmido pAfPQ510-2. 30
Tabla 7	Secuencias codificantes encontradas en el plásmido pAfPQ510-3. 32
Tabla 8	Características generales del plásmido pAfPQ506-1. 37
Tabla 9	Secuencias codificantes encontradas en el plásmido pAfPQ506-1. 39
Tabla 10	Identidad de los genes <i>arsA</i> , <i>arsD</i> , <i>arsC</i> , <i>arsR</i> y <i>arsB</i> del plásmido pAfPQ506-1 a los genes homólogos de plásmidos de diferentes bacterias según el servidor RAST. 43
Tabla 11	Identidad de los genes <i>arsA</i> , <i>arsD</i> , <i>arsC</i> , <i>arsR</i> y <i>arsB</i> del plásmido pAfPQ506-1 a los genes homólogos del cromosoma de diferentes bacterias según el servidor RAST. 44

## RESUMEN

Análisis genómico de plásmidos de *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ510 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506 aislados de una zona minera de Cerro de Pasco - Perú

Las bacterias del género *Acidithiobacillus* son quimiolitotróficas que crecen en ambientes ácidos, especialmente en drenajes ácidos de minas con metales pesados. Aceleran la disolución oxidativa de minerales azufrados facilitando la recuperación de metales de importancia comercial mediante la biolixiviación. Son útiles en la biorremediación de ambientes contaminados con metales tóxicos, como por ejemplo el arsénico, por su capacidad para oxidar y reducir metales. Varias de estas características y otras necesarias para adaptarse a ambientes extremos están codificadas en plásmidos que están relativamente poco estudiados. El objetivo fue caracterizar comparativamente los genomas de los plásmidos de las cepas *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ510 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506 aisladas de aguas ácidas de zonas mineras de Cerro de Pasco, Perú. Los plásmidos fueron purificados y enviados para su secuenciación. Se hizo el ensamblaje, la anotación y el análisis comparativo de las secuencias plasmídicas de ambas cepas. En *A. ferrivorans* PQ510 se encontraron tres plásmidos, uno de 28369 pb (denominado pAfPQ510-1), otro de 16745 pb (denominado pAfPQ510-2), y el tercero de 12365 pb (denominado pAfPQ510-3), los cuales presentan genes implicados en proteger a la célula del estrés oxidativo, en la supervivencia en ambientes extremos y en la replicación, mantenimiento y movilización del plásmido. En *A. ferrooxidans* PQ506 se encontró un plásmido de 14204 pb, denominado pAfPQ506-1, que porta genes de resistencia a arsénico conformando el operón *arsADCRB* y genes codificantes de otras proteínas, como disulfuro óxidoreductasa dependiente de FAD, proteína hipotética con dominio CBS, proteínas de replicación, de movilización y proteínas hipotéticas. Estos genes probablemente contribuyen a la resistencia al arsénico y a la replicación, mantenimiento y movilización del plásmido. Los genes del operón *arsADCRB* pueden haber sido adquiridos por transferencia genética horizontal en el ambiente extremo en el que habitan estas especies. El hallazgo de este operón en pAfPQ506-1 es el primer reporte de genes de resistencia a arsénico en plásmidos de *A. ferrooxidans*. El análisis comparativo del operón *arsADCRB* con diversos plásmidos y cromosomas de bacterias (publicados en bases de datos GenBank y servidor RAST), reveló que tenían una identidad elevada con genes *ars* de cepas de *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrivorans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans*. La generación de conocimientos a nivel molecular de estos plásmidos es importante para desarrollar métodos de biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados y mejorar los procesos de biolixiviación, mediante próximas investigaciones.

Palabras clave: *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, operón *ars*, secuenciación de plásmidos, anotación funcional, biominería, Perú.

## ABSTRACT

Genomic analysis of *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ510 and *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506 plasmids isolated from a Cerro de Pasco - Peru mining area

The bacteria of the genus *Acidithiobacillus* are chemolithotrophic that grow in acidic environments, especially in acid drainage of heavy metal mines. They accelerate the oxidative dissolution of sulfur minerals facilitating the recovery of metals of commercial importance through bioleaching. They are useful in bioremediation of contaminated environments with toxic metals, such as arsenic, for their ability to oxidize and reduce metals. Several of these characteristics and others necessary to adapt to extreme environments are encoded in plasmids that are relatively poorly studied. The aim was to characterize comparatively the plasmid genomes of the *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ510 and *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506 strains isolated from acidic waters of mining areas of Cerro de Pasco, Peru. Plasmids were purified and sent for sequencing to Macrogen Korea. Assembly, annotation, and comparative analysis of the plasmid sequences of both strains were made. In *A. ferrivorans* PQ510 three plasmids were found, one of 28369 bp (called pAfPQ510-1), another of 16745 bp (called pAfPQ510-2) and the third of 12365 bp (called pAfPQ510-3), which have genes involved in which present genes involved in protecting the cell from oxidative stress, in survival in extreme environments and in the replication, maintenance and mobilization of the plasmid. In *A. ferrooxidans* PQ506 one plasmid was found of 14204 bp, called pAfPQ506-1, that carries arsenic resistance genes forming the *arsADCRB* operon and genes encoding other proteins, such as such as FAD-dependent disulfide oxidoreductase, hypothetical protein with CBS domain, replication, mobilization proteins and hypothetical proteins. These genes probably contribute to arsenic resistance and plasmid replication, maintenance and mobilization. The *arsADCRB* operon genes may have been acquired by horizontal genetic transfer in the extreme environment in which these species live. The find of this operon in pAfPQ506-1 is the first report of arsenic resistance genes in *A. ferrooxidans* plasmids. Comparative analysis of the *arsADCRB* operon with various plasmids and chromosomes of bacteria (published in GenBank databases and RAST server), revealed that they had a high identity with *ars* genes of *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrivorans* and *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains. The generation of knowledge at the molecular level of these plasmids is important to develop methods of bioremediation of environments contaminated with heavy metals and improve bioleaching processes, through further research.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *ars* operon, plasmid sequencing, functional annotation, biomining, Peru.

## 1. INTRODUCCIÓN

La minería es una de las actividades más importantes por la generación de divisas, la generación de empleos, la participación activa en el incremento del Producto Bruto Interno y en el ingreso per cápita nacional; sin embargo, tiene un aspecto negativo que es la producción de relave que está compuesto por ácidos, iones metálicos como cobre, plomo, zinc, níquel, hierro, arsénico, cadmio, entre otros, causando impactos negativos ambientales, sociales (incluyendo daño a la salud de las personas) y económicos. Así, ríos y lagunas contienen elementos minerales y ácidos que deterioran la pureza de sus aguas, con lo cual se impide la mantención de vida o el uso para el consumo humano (agricultura, agua potable). Los impactos económicos derivados de los tratamientos deficientes de los relaves se han hecho más patentes a partir del caso de accidentes que han generado perjuicios importantes en actividades productivas, tales como la agricultura o la piscicultura (Cruzado y Bravo, 2010). En el caso de la salud humana, la afectación dependerá del metal; así, el cobre (Cu) produce la fiebre del metal, las exposiciones de largo periodo irritan las mucosas, causa dolor de cabeza, estómago, mareos, vómitos, diarreas, daño al hígado y los riñones (Rodríguez, 2017); el mercurio (Hg) es altamente tóxico para el sistema nervioso, puede producir daños graves en el cerebro del feto y reduce la inmunidad (Ayangbenro y Babalola, 2017; Reyes et al., 2016); el cadmio (Cd) se acumula en órganos vitales produciendo daños irreversibles aún a concentraciones reducidas (Reyes et al., 2016), el arsénico (As) causa problemas respiratorios, enfermedades cardiovasculares, gastrointestinales y efectos cancerígenos (Reyes et al., 2016), la toxicología de los metales pesados está bien documentada (Marruecos et. al., 1993; Ayangbenro y Babalola, 2017; Rodríguez, 2017). Una manera de mitigar los efectos negativos y recuperar ambientes contaminados es mediante la biorremediación, que es un conjunto de técnicas que permiten resolver problemas de contaminación mediante el uso de microorganismos, hongos, plantas o sus productos (Ayangbenro y Babalola, 2017; Jerez, 2009). *Acidithiobacillus* es una de las bacterias útiles para este proceso porque crece a pHs muy ácidos (1 a 2) con concentraciones altas de metales y tiene capacidad de biosorción de éstos (Liu et al., 2004; Aston et al., 2010; Yan et al., 2010; Navarro et al., 2013).



Por otro lado, *Acidithiobacillus* es ampliamente utilizado en los procesos de biolixiviación, que viene a ser la solubilización de cationes metálicos a partir de sólidos insolubles mediante la oxidación de hierro y/o sulfuros (Yan et al., 2017; Jerez 2009), es un proceso de bajo costo, de poco consumo de energía y de menor impacto sobre el ambiente que los procesos industriales convencionales (Jerez, 2017); *A. ferrooxidans* es la principal especie bacteriana usada en la solubilización de cobre, oro y uranio (Valdés et al., 2008; Jerez 2009; Jerez 2017), pero también es muy útil para eliminar metales tóxicos como Cu, Cd, Ni, Li, Co y Fe tanto de suelos como de desechos contaminantes del ambiente, tales como baterías convencionales y de litio (Jerez 2017). Se ha descrito que la capacidad lixivante de esta bacteria se puede aprovechar para recuperar metales de diversos tipos de desechos, tanto de la minería, como de otras industrias y domésticos, como por ejemplo cables eléctricos, circuitos, pilas, entre otros (Zhang et al., 2018). *A. ferrivorans* es una especie psicrófila (Hallberg et al., 2010) que solubiliza metales en ambientes ácidos a baja temperatura (Liljeqvist et al., 2011; Liljeqvist et al., 2015; Zou et al., 2015), tiene utilidad potencial para la biolixiviación y eliminación de metales tóxicos de ambientes contaminados que tienen bajas temperaturas como son las regiones altoandinas.

La eficiencia de estos microorganismos en biolixiviación y en biorremediación puede mejorarse mediante su modificación genética a través del uso de plásmidos debidamente caracterizados, obtenidos de bacterias autóctonas que habitan en estos ambientes, como *Acidithiobacillus*. Asimismo, la caracterización de estos plásmidos incrementará el conocimiento sobre su papel en la fisiología, estilo de vida y adaptación de *Acidithiobacillus* a las condiciones extremas en que habita. Sin embargo, el conocimiento de las características genómicas de los plásmidos de *Acidithiobacillus* es escasa, menos aún los de *Acidithiobacillus ferrivorans* por ser una especie recientemente descubierta (Hallberg et al., 2010), y, con respecto a los plásmidos de aislados autóctonos de Perú, sólo existe una investigación previa (Eca, 2016) y el presente estudio.

Puesto que contamos, en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, con cepas de *A. ferrivorans* y *A. ferrooxidans* que presentan plásmidos (Eca, 2016), aisladas de zonas mineras de Cerro de Pasco, se ha realizado el actual estudio orientado a caracterizar comparativamente los genomas

de los plásmidos de las cepas *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ510 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506, lo cual es relevante para generar nuevos conocimientos sobre las regiones codificantes que portan y su potencial contribución a la sobrevivencia de las bacterias bajo el estrés por las condiciones ambientales extremas, como los metales pesados. Estos conocimientos facilitarán, en un futuro cercano, el aprovechamiento de los plásmidos como recursos genéticos a ser usados en diversas aplicaciones biotecnológicas relacionadas a la industria minera, como la biorremediación y la biolixiviación.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Biominería

La biominería es un procedimiento económico y ecológicamente aceptable para solubilizar metales a partir de minerales sulfurosos de baja ley por medio de microorganismos (Schippers et al., 2013). Biominería es un término general que puede usarse para referirse a los procesos de biolixiviación y de biooxidación (Rawlings, 2002). El término biolixiviación se refiere a la conversión de un metal insoluble (usualmente un sulfuro metálico, por ejemplo, CuS (covelita), NiS (millerita), ZnS (esfalerita) en una forma soluble (generalmente sulfatos metálicos, por ejemplo, CuSO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>), de manera que el metal puede ser extraído en agua. Puesto que este proceso es una oxidación también se le llama biooxidación, sin embargo, este término se usa principalmente para referirse al proceso en el cual la recuperación de un metal se incrementa por la acción microbiana sobre el mineral sin que el metal que está siendo recuperado sea solubilizado. Su solubilización se hace en un paso adicional. Un ejemplo es la recuperación de oro a partir del mineral arsenopirita donde el oro permanece en el mineral después de la biooxidación y es extraído por tratamiento con cianuro en un subsiguiente paso. Queda claro que el término biolixiviación es inapropiado cuando se refiere a la recuperación de oro (Rawlings, 2002).

#### 2.1.1. Biolixiviación

Para entender mejor el concepto básico de este proceso, se explica a continuación una operación típica de biolixiviación de un mineral que contiene cobre en forma insoluble como por ejemplo CuS (monosulfuro de cobre o covelita) o CuFeS<sub>2</sub> (disulfuro de hierro y cobre o calcopirita): El mineral insoluble de Cu se pulveriza primero y se coloca en pilas. Las pilas son luego rociadas con ácido sulfúrico, y aireadas para promover la oxidación microbiana de los compuestos de hierro y azufre. La biolixiviación ocurre en dos pasos: primero, la oxidación biológica de Fe(II) para producir Fe(III); segundo, la oxidación química de Cu(I) a la forma más soluble Cu(II) por el Fe(III) el cual se reduce a Fe(II) en este proceso (Valdés et al., 2008). *Acidithiobacillus ferrooxidans* juega un papel

clave al reoxidar el Fe(II) a Fe(III), completando así el ciclo y permitiendo que continúe la biolixiviación (Fig. 1). El ácido sulfúrico producido por la oxidación biológica de los compuestos de azufre reducido también promueve la solubilización del Cu(II). El cobre se recupera de esta solución ácida usando tecnologías fisicoquímicas tales como la extracción de solvente y la galvanización (Valdés *et al.*, 2008).

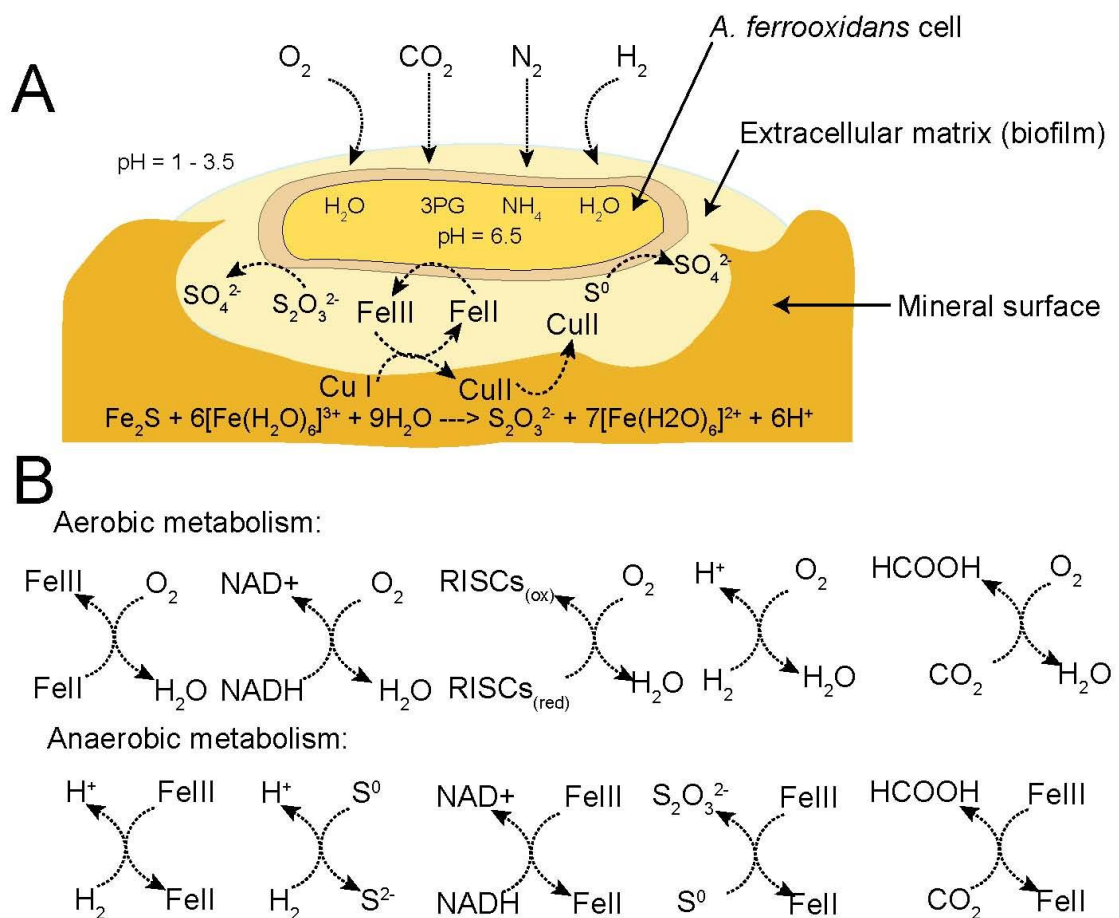


Fig. 1. *Acidithiobacillus ferrooxidans* y su posible papel en la biolixiviación. El metabolismo quimiolitoautótrofo de *A. ferrooxidans* resulta en la oxidación/reducción de compuestos de hierro y azufre y la solubilización del cobre y otros metales de valor comercial en un proceso llamado biolixiviación o biominería. Las operaciones de biolixiviación también resultan en la producción de soluciones ácidas en ambientes prístinos y en drenaje ácido de minas. A) Modelo de biolixiviación de cobre por *A. ferrooxidans*. B) Reacciones de oxidación/reducción llevadas a cabo por *A. ferrooxidans*. 3PG: 3-fosfoglicerato.  
FUENTE: Valdés *et al.*, 2008.

La biolixiviación tiene importancia porque alcanza el 10% de la producción de cobre en el mundo y es una tecnología particularmente importante para minerales con bajo porcentaje de cobre que de otra manera son costosos para extraer (Valdés *et al.*, 2008). Asimismo, la biolixiviación es más amigable con el ambiente porque no requiere de las grandes cantidades de energía que se usan durante la torrefacción o fundición y no produce dióxido de azufre u otras emisiones gaseosas perjudiciales para el ambiente (Rawlings, 2002), tampoco produce arsénico. La desventaja es que genera un drenaje ácido que debe manejarse para evitar su liberación al ambiente (Valdés *et al.*, 2008).

#### 2.1.2. Biorremediación de ambientes contaminados con metales

La biorremediación es un conjunto de técnicas que permiten resolver problemas de contaminación ambiental mediante el uso de microorganismos, hongos, plantas o sus productos, para restaurar los ambientes poluídos a su condición original (Jerez, 2009; Ayangbenro y Babalola, 2017). Estas técnicas son amigables con el ambiente y costo-efectiva para remover o recuperar metales pesados (Ayangbenro y Babalola, 2017). Los microorganismos han desarrollado mecanismos para vivir en ambientes poluídos con metales pesados, tales como la bioacumulación, biomineralización, biosorción y biotransformación, los cuales pueden ser aprovechados en tratamientos *in situ* (en el mismo sitio de la contaminación), o *ex situ* (el sitio contaminado es excavado o bombeado y tratado lejos del punto de contaminación) (Ayangbenro y Babalola, 2017).

La actividad minera suele contaminar el ambiente con ácidos (drenaje ácido de minas) y metales no recuperados, lo que debe ser remediado (Jerez 2017). También hay otras fuentes antropogénicas de contaminación con metales, así como fuentes naturales; entre las fuentes antropogénicas, además de la minería, están la producción de aleaciones, deposición atmosférica, producción de baterías, fabricación de explosivos, apilamiento inadecuado de residuos sólidos industriales, curtido de cuero, pesticidas, fertilizantes fosfatados, materiales fotográficos, pigmentos para impresión, riego con aguas residuales, fundición, industrias de acero y galvanizado, textiles, tintes y preservación de maderas;

entre las fuentes naturales están la erosión y erupciones volcánicas (Ayangbenro y Babalola, 2017).

Un ejemplo interesante de eliminación de metales tóxicos es el uso de una combinación de microorganismos con dos actividades biológicas opuestas: oxidantes de sulfuros con reductores de sulfatos (Jerez 2017).

La capacidad de biolixiviación de *Acidithiobacillus*, también se ha usado con éxito para evitar la contaminación con metales en las sociedades modernas, por ejemplo, para recuperar cadmio, níquel y hierro de baterías desechadas, litio y cobalto de baterías de litio, cobre de desechos electrónicos, entre otros (Jerez 2017; Zhang et al., 2018).

Se ha encontrado que es muy efectivo el uso de precipitados de jarosita (sulfato hidróxido de hierro y potasio,  $\text{KFe}_3^{3+}(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ ) generados por *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*, en la biorremoción de arsénico (Natarajan, 2008). Se ha demostrado que algunas cepas de *A. ferrooxidans* fueron capaces de volatilizar y recuperar casi el 100% de mercurio de suelos y aguas contaminados, gracias a su actividad de volatilización de mercurio dependiente de ion ferroso así como de su actividad reductasa de mercurio dependiente de NADPH (Takeuchi y Sugio, 2006). Asimismo, se ha determinado la biorremoción de uranio (VI) de aguas contaminadas, usando cepas de *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*, debido a su capacidad de biosorción cuya cinética fue estudiada (Gargarello et al., 2010; Romero-González et al., 2016).

## 2.2. Diversidad microbiana en hábitats de drenajes ácidos de minas

En el Perú hay pocas investigaciones sobre biodiversidad microbiana en drenajes ácidos de minas, Abanto et al. (2013), reportaron las especies de bacterias acidofílicas oxidantes de hierro *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. ferrivorans*, *A. ferridurans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidiphilium sp.*

Schippers et al. (2013), ofrecen una visión general sobre los microorganismos oxidantes de sulfuro metálico, que se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Filogenia de microorganismos acidófilos oxidantes de sulfuros metálicos

Especies <sup>a</sup>	Phylum	G + C (mol%)
<b>Bacterias mesófilas y termófilas moderadas</b>		
<i>Acidiferrobacter thiooxydans</i>	Proteobacteria	63
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	Actinobacteria	67–69
<i>Acidithiobacillus albertensis</i>	Proteobacteria	61.5
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	Proteobacteria	63–64
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Proteobacteria	58–59
<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	Proteobacteria	55.5
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	Proteobacteria	52
“ <i>Acidithiomicrobium P1/P2</i> ”	Actinobacteria	55/51
<i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i>	Firmicutes	53
<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	Firmicutes	49
<i>Alicyclobacillus GSM</i>	Firmicutes	50.5
<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>	Actinobacteria	55
<i>Ferrithrix thermotolerans</i>	Actinobacteria	50
<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	Nitrospira	55–58
“ <i>Leptospirillum ferrodiazotrophum</i> ”	Nitrospira	na
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Nitrospira	52
<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	Firmicutes	55–57
<i>Sulfobacillus benefaciens</i>	Firmicutes	50
“ <i>Sulfobacillus montserratensis</i> ”	Firmicutes	52
<i>Sulfobacillus sibiricus</i>	Firmicutes	48
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	Firmicutes	48–50
<i>Sulfobacillus thermotolerans</i>	Firmicutes	48
“ <i>Thiobacillus plumbophilus</i> ”	Proteobacteria	66
“ <i>Thiobacillus prosperus</i> ”	Proteobacteria	64
<i>Thiomonas cuprina</i>	Proteobacteria	66–69
<b>Arqueas mesófilas y termófilas moderadas</b>		
<i>Acidiplasma cupricumulans</i>	Euryarchaeota	34
“ <i>Ferropasma acidarmanus</i> ”	Euryarchaeota	37
<i>Ferropasma acidiphilum</i>	Euryarchaeota	36.5
<b>Arqueas termófilas extremas</b>		
<i>Acidianus brierleyi</i>	Crenarchaeota	31
<i>Acidianus infernus</i>	Crenarchaeota	31
<i>Acidianus sulfidivorans</i>	Crenarchaeota	31
<i>Metallosphaera hakonensis</i>	Crenarchaeota	46
<i>Metallosphaera prunae</i>	Crenarchaeota	46
<i>Metallosphaera sedula</i>	Crenarchaeota	45
<i>Sulfolobus metallicus</i>	Crenarchaeota	38
<i>Sulfolobus yangmingensis</i>	Crenarchaeota	42
<i>Sulfurococcus mirabilis</i>	Crenarchaeota	~44
<i>Sulfurococcus yellowstonensis</i>	Crenarchaeota	45

<sup>a</sup>Listado en orden alfabético; G+C = mol% contenido de guanina + citosina del DNA genómico; na = dato no disponible; especies no incluidas en la nomenclatura (<http://www.bacterio.cict.fr/>) están entre comillas.

Fuente: Schippers et al. (2013).

### 2.2.1. *Acidithiobacillus*

Las especies del género bacteriano *Acidithiobacillus* son las que comúnmente habitan los ambientes de drenajes ácidos de minas por ser acidófilas, es decir, con crecimiento óptimo a pH 2–3 (Méndez-García *et al.*, 2015). Las especies de este género descritas antes del año 2000 estaban incluidas en el género *Thiobacillus*, pero después de los análisis de secuencia del 16S rRNA, quedó claro que pertenecían a otra clase de las Proteobacteria (Rawlings, 2002) creándose el nuevo género *Acidithiobacillus* (Kelly y Wood, 2000) para acomodar a los miembros altamente acidófilos. Son bacilos (0.4 x 0.2 µm) gramnegativos, aeróbicos, acidófilos obligados, móviles por uno o más flagelos. Usan compuestos de azufre reducido para su crecimiento quimiolitotrofo y algunas especies oxidan el ión ferroso y sulfuros metálicos naturales y sintéticos para la generación de energía; algunas especies oxidan hidrógeno. Contienen ubiquinona Q-8. El contenido de G-C del DNA es 52±64 mol%. La temperatura óptima para las especies mesófilas es de 30±35 °C y para las moderadamente termófilas 45 °C (Kelly y Wood, 2005). La especie *Acidithiobacillus ferrivorans* es psicrotolerante porque si bien su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C, se ha determinado que crece bien (oxidando el ión ferroso) a 10 y a 4°C (Hallberg *et al.*, 2010).

Jerarquía taxonómica:

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria (Garrity *et al.*, 2005a)

Clase: Acidithiobacillia (Williams y Kelly, 2013)

Orden: *Acidithiobacillales* (Garrity *et al.*, 2005b)

Familia: *Acidithiobacillaceae* (Garrity *et al.*, 2005c)

Género: *Acidithiobacillus* (Kelly and Wood, 2000)

Especies: *At. albertensis* (Bryant *et al.*, 1988; Kelly y Wood, 2000)

*At. caldus* (Hallberg y Lindstrom, 1994; Kelly y Wood, 2000)

*At. ferridurans* (Hedrich y Johnson, 2013)

*At. ferriphilus* (Falagán y Johnson, 2016)

*At. ferrivorans* (Hallberg *et al.*, 2010)

*At. ferrooxidans* (Temple y Colmer, 1951; Kelly y Wood, 2000)



*At. thiooxidans* (Waksman y Joffe, 1922; Kelly y Wood, 2000)

#### 2.2.1.1. *Acidithiobacillus ferrivorans*

*Acidithiobacillus ferrivorans* es una bacteria Gram-negativa, psicotolerante (crece óptimamente a 27-32°C, pero puede hacerlo desde 4°C), acidófila pero menos tolerante a pH extremadamente bajo que *A. ferrooxidans*. Presenta movilidad, es anaeróbica facultativa y quimiolitotrofa (Hallberg *et al.*, 2010). Fija CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, oxida Fe<sup>2+</sup> por un mecanismo diferente al de *A. ferrooxidans* puesto que carece de la rusticianina RusA y, más bien, produce la proteína homóloga RusB (Hallberg *et al.*, 2010). Es una de las pocas especies acidófilas capaces de oxidar el ión Fe<sup>2+</sup> y los compuestos de azufre inorgánico reducido a temperaturas <10°C (Tran *et al.*, 2017; Liljeqvist *et al.*, 2011). Crece con Fe<sup>2+</sup>, S<sup>0</sup>, sulfuro, tetrionato, tiosulfato y minerales sulfurados como donadores de electrones; y en condiciones anaeróbicas, crecen con Fe<sup>3+</sup> como aceptor de electrones y S<sup>0</sup> como donador de electrones (Hallberg *et al.*, 2010).

Se han secuenciado las cepas SS3, CF27 y PQ33 encontrando que los cromosomas tenían un tamaño de 3.15, 3.4 y 3.29 Mb, respectivamente (Liljeqvist *et al.*, 2011; Tran *et al.*, 2017; Ccorahua-Santo *et al.*, 2017). En el cromosoma se identificaron genes para su adaptación al frío, a ambientes ricos en metales, y se encontró un gran número de islas genómicas con genes de función desconocida (Tran *et al.*, 2017). En la cepa CF27 se ha encontrado un plásmido de 46.5Kb (Tran *et al.*, 2017) y en la cepa PQ33 se han reportado plásmidos de 10.2 y 12 Kb (Eca, 2016), de los cuales se va a explicar con más amplitud en 2.3.1.

*A. ferrivorans* cataliza la solubilización de metales a baja temperatura en el proceso biotecnológico de biolixiviación y es la especie dominante durante la disolución de minerales de sulfuro multimetálicos complejos a 7°C (Liljeqvist *et al.*, 2011).

### 2.2.1.2. *Acidithiobacillus ferrooxidans*

*Acidithiobacillus ferrooxidans* es una bacteria Gram-negativa y mesófila puesto que crece óptimamente a 30°C. Es acidófila obligada y extrema debido a que crece bien a pH 2 pero puede hacerlo a pH 1 o menos. Es anaeróbica facultativa y quimiolitotrofa (Quatrini y Johnson, 2019; Valdés et al., 2008). Genera energía (ATP) principalmente del transporte de protones  $H^+$  a través de la membrana citoplasmática, debido al enorme gradiente de pH transmembrana que ocurre naturalmente (pH extracelular 1.5–3.0 y pH intracelular 6.5) (Quatrini y Johnson, 2019). Fija  $CO_2$ ,  $N_2$ , y obtiene energía a partir de la oxidación de  $Fe^{2+}$  y de azufre reducido, los cuales, junto con hidrógeno molecular son usados como donadores de electrones; el oxígeno molecular, ión férrico, y azufre son aceptores finales de electrones (Fig. 2) (Quatrini y Johnson, 2019; Zhang et al., 2018). Produce gran cantidad de rusticianina, una cuproproteína azul periplasmática, cuando crece en hierro (Quatrini y Johnson, 2019).

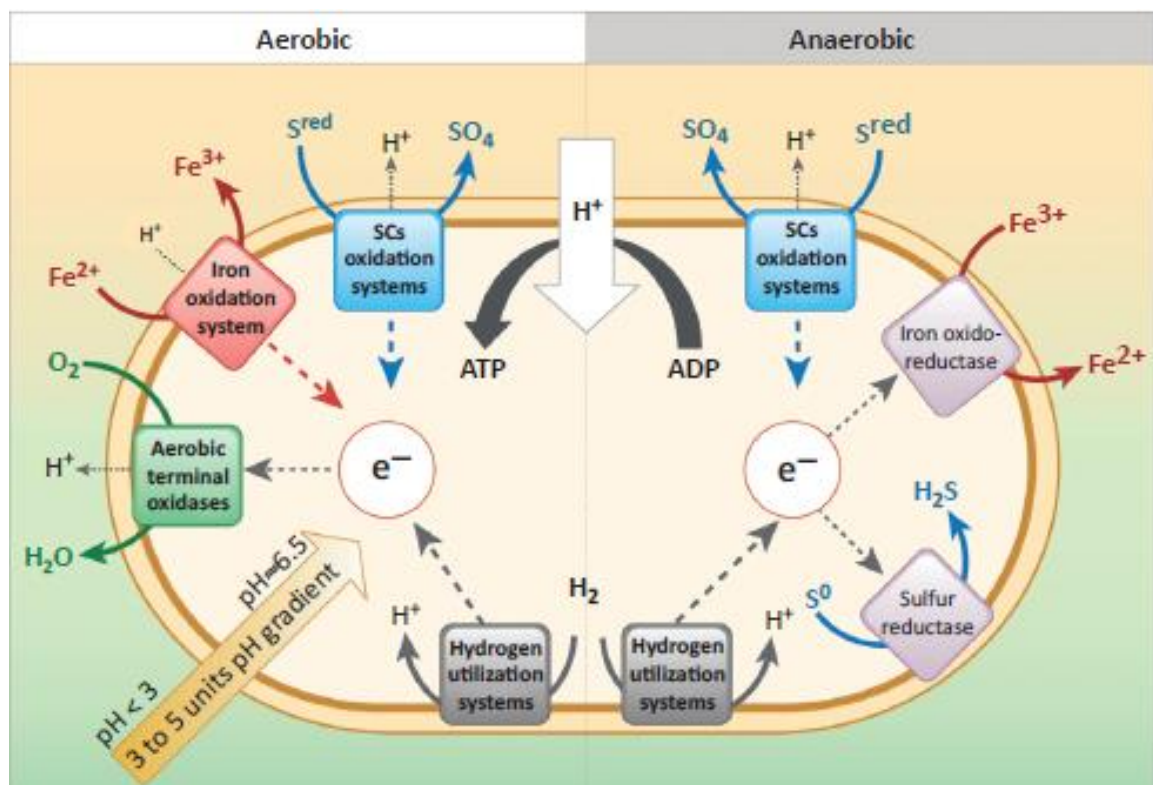


Fig. 2. Metabolismo de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Azufre reducido ( $S^{red}$ ), compuestos de azufre (SCs).

FUENTE: Quatrini y Johnson (2019)

La cepa tipo de esta especie (ATCC 23270) fue la primera bacteria acidófila en ser secuenciada, encontrando un genoma consistente en un único cromosoma circular de 2.98 Mb, sin plásmidos, ni provirus, y pocos elementos genéticos móviles integrados (Quatrini and Johnson, 2019); pero en la cepa ATCC 53993 se ha reportado una isla genómica de 160 Kb con varios genes codificantes de una cobre-ATPasa y de un sistema de tolerancia al cobre (Martínez-Bussenius et al., 2016); y desde hace varios años, diversos autores han publicado el hallazgo de plásmidos en cepas de esta especie y otras de *Acidithiobacillus*, lo que se amplía más adelante (ver 2.3.1.). En otras cepas secuenciadas se han encontrado cromosomas que varían de 2.89 a 4.18 Mb y genes 16S rRNA con diferencias en sus secuencias, indicando la existencia de diferentes genomovares (Zhang et al., 2018).

*A. ferrooxidans* es abundante en ambientes naturales donde hay minerales de pirita, depósitos de carbón y sus drenajes ácidos, y es importante en los consorcios bacterianos para recuperar cobre mediante biolixiviación (Valdés et al., 2008). Tiene aplicaciones potenciales en la remoción de sulfuros de sólidos y de gases, en el reciclaje de metales de minerales, de desechos eléctricos y de lodos, en la síntesis de productos bioquímicos de interés comercial como ácido butírico, o como jarosita, schwertmannita y akaganeita, que son oxihidroxisulfatos de hierro considerados eliminadores eficientes de metales pesados y algunos iones tóxicos; asimismo, esta especie tiene aplicación en la manufactura (*biomachining*) de piezas metálicas, removiendo metales para formar microestructuras en piezas de trabajo o microcomponentes con alta calidad, precisión, menos calor y mínimo estrés (Zhang et al., 2018).

### 2.3. Plásmidos

Son elementos de DNA extracromosómicos, relativamente pequeños, con un número variable de copias y de tamaños, principalmente circulares (algunos son lineales), que se replican autónomamente (independientemente del cromosoma) y que portan genes que facilitan la adaptación de las bacterias a los cambios del ambiente en el que se encuentran, es decir, características que son periféricas a la división celular y a la producción de la estructura básica de la célula (Dale y Park, 2010). Otorgan flexibilidad al organismo (fenotipo adicional) para responder

a los cambios en su ambiente, ya sean hostiles (por ejemplo, presencia de antibióticos) o favorables (por ejemplo, disponibilidad de un nuevo sustrato) (Dale y Park, 2010; Smalla et al., 2015). El papel de los plásmidos es particularmente significativo debido a la facilidad relativa con la que se transfieren entre cepas o entre especies (Dale y Park, 2010). Además de los genes de para su propia replicación, segregación y transferencia, portan genes de resistencia a antibióticos, a metales pesados, a la radiación y otras condiciones ambientales; portan genes de bacteriocinas, de determinantes de virulencia, de actividades metabólicas, entre otras características (Dale y Park, 2010).

### 2.3.1. Plásmidos de *Acidithiobacillus*

Existen varias publicaciones sobre plásmidos en *Acidithiobacillus*, la mayoría de los cuales se refieren a *A. ferrooxidans*, *A. caldus* y sólo dos a *A. ferrivorans*. El primer estudio que reportó plásmidos de *Acidithiobacillus* fue el de Mao et al. (1980), extrayendo cinco de diferentes tamaños denominados pTF1 hasta pTF5, los cuales no fueron caracterizados genéticamente. En otro estudio, se analizaron los perfiles de plásmidos de 15 cepas de *A. ferrooxidans* originarias en su mayoría de Estados Unidos y Bulgaria, encontrando que eran de tamaños variados (7.4 a 75 kb) y que no tenían función sobre el uso del sustrato de crecimiento: ión  $\text{Fe}^{2+}$  o tetrionato, porque al cambiarlos no variaba el perfil plasmídico (Martin et al., 1981). También se han reportado plásmidos de 18.6 a 65 kb en nueve cepas de *A. ferrooxidans* aisladas de una mina de uranio, sugiriendo la probable participación de un plásmido de 20 Kb en la resistencia a este elemento, lo que no fue demostrado (Martin et al., 1983). Analizando más de 100 cepas de *A. ferrooxidans* aisladas de minas japonesas se encontró que el 73 % portaba uno o más plásmidos de 2 a 30 Kb (Shiratori et al., 1991).

Varios investigadores han sugerido la implicancia de plásmidos de *A. ferrooxidans* en la resistencia a metales y metaloides como mercurio, plata, arsénico, cobre, hierro y zinc (Rawlings et al., 1984; Rawlings et al., 1986; Visca et al., 1986; Rawlings et al., 1993; Clennel et al., 1995; Pramila et al., 1996), sin embargo, en ninguno de los plásmidos de esta especie se ha probado definitivamente que sean portadores de genes de resistencia a metales, los

cuales se han encontrado principalmente en el cromosoma de la bacteria (Banerjee, 2004).

La mayoría de los plásmidos de *A. ferrooxidans* se han descrito como crípticos, y se han realizado diversos estudios genéticos de los mismos (Banerjee, 2004). Así, los plásmidos crípticos de esta especie pTF33020-1, pTF33020-2, pTF-FC2 y pTF35 fueron clonados en pBR325 para investigar sus genes de inicio de la replicación, transferencia y movilización, encontrando que sí se expresaban en cepas de *E. coli* (Rawlings y Woods, 1985). Se determinó que el plásmido pTF-FC2, de amplio rango de huéspedes, constaba de una región de replicación similar a la de los plásmidos del grupo de incompatibilidad Q, una región de movilización similar a la de los plásmidos de incompatibilidad P y un transposón, por lo que parece ser un híbrido natural (Rawlings et al., 1993). Se demostró que el plásmido pTF1, de reducido rango de huéspedes, tenía un origen de transferencia similar al del plásmido de *E. coli* RSF1010 del grupo de incompatibilidad Q y se pudieron identificar las proteínas de movilización MobL y MobS (Drolet et al., 1990; Drolet y Lau, 1992). Un estudio comparativo de varios plásmidos de *A. ferrooxidans* encontró que tenían un origen de replicación común al plásmido pTFI91 de 9.8 kb, el cual no se expresó en *E. coli* ni en *Pseudomonas putida*, pero que estaba ampliamente distribuido entre las cepas de *A. ferrooxidans* (Chakravarty et al., 1995). Otro estudio encontró al plásmido pTFI91 entero dentro del plásmido pTF5 de 19.75 kb (Dominy et al., 1998). En una publicación se reporta la secuencia completa del plásmido pT3.2I de 15.39 kb, con una secuencia altamente homóloga al *ori* de plásmidos ColE2 del grupo de incompatibilidad B (Aparicio et al., 2000). Una clase diferente de plásmidos, pTfA6 de 2.4 kb, se encontró en la cepa *A. ferrooxidans* A-6, el cual presentaba secuencias similares a la de la proteína de replicación RepA de plásmidos pequeños de *Nitrosomonas* sp. (Roberto, 2003). Se ha reportado la secuencia completa de un plásmido de la cepa *A. ferrooxidans* YNTRS-40 aislada de aguas termales en China (Zhang et al., 2020).

En *Acidithiobacillus caldus* se han hecho varios reportes de plásmidos. El plásmido pTC-F14 de 14.15 kb es similar a los plásmidos del grupo IncQ, que son promiscuos, movilizables y de amplio rango de huéspedes, y su región de replicación y de movilización es similar al plásmido pTF-FC2 de *A. ferrooxidans*, lo que sugiere que los plásmidos similares a IncQ son vehículos potenciales de

transferencia horizontal de genes entre bacterias de diferentes ambientes (Gardner et al., 2001; Goldschmidt et al., 2003; Gardner y Rawlings, 2004). Otros 3 plásmidos crípticos de 29 a 65 kb fueron aislados de diferentes cepas de *A. caldus* observando que tenían una región común, además de genes de resistencia a arsénico, de movilización y estabilidad (van Zyl et al., 2008). Se han encontrado 4 plásmidos, un megaplásmido >150 Mb y tres más pequeños, que se han comparado a otros plásmidos de *A. caldus* aislados anteriormente (Acuña et al., 2013).

En *A. ferrivorans* cepa CF27 se encontró un plásmido de 46.5 Kb que porta un sistema de eflujo de múltiples drogas (*acr*) y operones de resistencia al cobre (*cus*) (Tran et al., 2017).

En el Perú, el primer aislamiento de plásmidos de *Acidithiobacillus* fue realizado por Eca (2016), encontrando que 17 de 24 aislados de *Acidithiobacillus* de zonas mineras del Perú, portaban plásmidos (Fig. 3). Se secuenciaron completamente dos plásmidos de la bacteria psicrotolerante *A. ferrivorans* cepa PQ33, denominados pAfPQ33-1 y pAfPQ33-2, en los que se identificaron genes putativos con posible capacidad de transferencia horizontal y sistemas de regulación implicados en el mantenimiento de los plásmidos. En pAfPQ33-1 destaca el gen de la proteína diguanilato ciclasa implicada en la formación de biopelícula, importante para la adherencia a sustratos sulfurados, y en pAfPQ33-2 resalta el gen putativo de la porina fosfato selectiva, cuya función es la recuperación de fosfato y posiblemente esté involucrada en la adaptación de esta especie a condiciones de estrés ambiental (Eca, 2016). Estos hallazgos han sido publicados recientemente (Ccoahua et al., 2021)

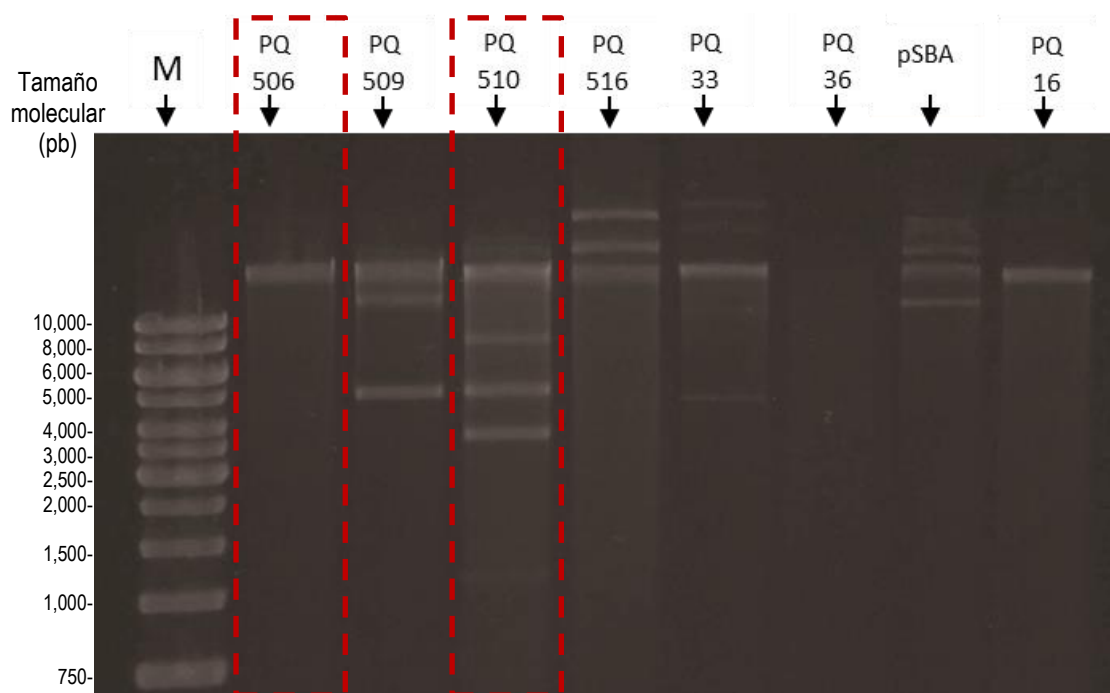


Fig. 3. Plásmidos aislados de las cepas de *Acidithiobacillus* provenientes de zonas mineras de Cerro de Pasco. Se visualizan mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. M, marcador de tamaño molecular 1 kb DNA Ladder (Promega ®).

Fuente: Eca, 2016.

En la Fig. 3 se resaltan las cepas *A. ferrooxidans* PQ506 y *A. ferrivorans* PQ510 cuyos plásmidos fueron enviados a secuenciar para el presente estudio.

#### 2.3.1.1. Genes de resistencia a metales en plásmidos

Estos genes se encuentran en el cromosoma, plásmidos o transposones, pero principalmente en plásmidos que se diseminan por transferencia horizontal. Se han determinado diversos operones como *czc* (resistencia a cadmio, zinc y cobalto), *ncc* (resistencia a níquel, cadmio y cobalto), *pbr* (resistencia a plomo), *pco* y *cop* (resistencia al cobre: eflujo y secuestro, respectivamente), *mer* (resistencia al mercurio), *ars* (resistencia al arsénico), entre otros (Fashola et al., 2016).

##### a) Operón *ars*

Los operones *ars*, descubiertos por primera vez en plásmidos bacterianos hace casi 50 años, son los sistemas de resistencia a arsénico más comunes en microorganismos. Los genomas procarióticos, incluyendo plásmidos, transposones e islas genómicas, portan numerosos operones *ars* con una



variedad de genes y diferentes combinaciones de ellos (Ben Fekih et al., 2018).

Ambas formas inorgánicas del arsénico, arsenato y arsenito, son las que exhiben mayor toxicidad y son las formas predominantes en los drenajes de aguas ácidas de las minas (Fashola et al., 2016). El arsenato imita a los grupos fosfato, ganando acceso a las células vía los sistemas de transporte destinados a su captación e inhibiendo una amplia variedad de reacciones como la fosforilación oxidativa; en tanto que el arsenito ingresa a través de las acuaglicerol porinas y reacciona con los grupos sulfhidrilo de las proteínas (Fashola et al., 2016; Fernández et al., 2016).

Las bacterias han desarrollado muchas estrategias en respuesta a la presencia de arsénico en el ambiente, como su expulsión mediante proteínas codificadas en operones *ars* (Fernández et al., 2016). Estos operones existen tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas y la mayoría tienen la estructura *arsRBC*, donde *arsR* codifica una proteína reguladora de respuesta a arsenito [As(III)] y antimonito [Sb(III)], *arsB* codifica un transportador dependiente del gradiente de protones responsable de la expulsión de [As(III)] y [Sb(III)], y *arsC* codifica una arsenato reductasa que reduce el arsenato [As(V)] a [As(III)], el cual luego es expulsado (Wang et al., 2004; Fashola et al., 2016). Algunas bacterias tienen el operón *ars* con la configuración *arsRDABC*, donde *arsD* codifica una proteína represora transcripcional adicional cuya secuencia primaria no está relacionada a ArsR pero que reconoce la misma región reguladora, en tanto que *arsA* codifica una ATPasa que es activada por [As(III)] y [Sb(III)], y que se une al transportador ArsB convirtiéndolo en una bomba de arsenito dependiente de ATP. También se ha demostrado que ArsD regula la expresión máxima de esta bomba dependiente de ATP, la cual si se sobreexpresase sería tóxica para la célula (Wang et al., 2004; Fashola et al., 2016). Se ha demostrado que las células que expresan los cinco genes *arsRDABC* son más resistentes al [As(V)] y al [As(III)], que aquellas que expresan sólo los genes *arsRBC* (Dey y Rosen, 1995; Yang et al., 2012). Otras bacterias tienen configuraciones diferentes del operón *ars*, como *arsRCDA* con *arsB* localizado separadamente (Peng et al., 2017), y otras diversas configuraciones halladas en múltiples bacterias (Kalia y Joshi, 2009).



#### b) Operón *mer*

Con respecto a las actividades mineras, uno de los elementos que se liberan al ambiente es el mercurio, especialmente durante el proceso de extracción de oro. Parte del Hg inorgánico que alcanza los ecosistemas acuáticos se convierte en Hg orgánico o metilmercurio (MeHg) por acción microbiana, el cual se acumula en los peces (Fashola et al., 2016). También, durante el proceso del rostizado en las actividades mineras, se libera Hg al aire que permanece suspendido debido a su naturaleza volátil y que puede ser inhalado (Fashola et al., 2016).

En las bacterias, los compuestos de mercurio causan estrés oxidativo porque generan un desbalance en la homeostasis pro-oxidante/antioxidante, disminuyendo los antioxidantes celulares. Los compuestos de mercurio, tanto el  $\text{Hg}^{2+}$  como el MeHg tienen alta afinidad por los grupos thiol (sulfhidrilo) de las proteínas, formando enlaces covalentes con los residuos de cisteína (Fashola et al., 2016).

Algunas bacterias resisten a la contaminación por medio de transformaciones químicas, como la reducción, oxidación, metilación y desmetilación (Nascimento y Chartone-Souza, 2003).

El operón *mer* de las bacterias permite detoxificar la célula mediante reducción enzimática de  $\text{Hg}^{2+}$  convirtiéndolo en mercurio metálico volátil  $\text{Hg}^0$ . Este operón varía en estructura y está compuesto por genes que codifican proteínas de regulación (*merR*), de transporte (*merC*, *merE*, *merF*, *merG*, *merT*), reductasa mercúrica (*merA*), liasa órganomercurial (*merB*), proteína periplasmática eliminadora (*merP*), proteína reguladora secundaria (*merD*) (Nascimento y Chartone-Souza, 2003; Chen et al., 2011; Mathema et al., 2011; Dash y Das, 2012; Fashola et al., 2016).

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1. Hipótesis

Existen secuencias codificantes de proteínas relacionadas a la adaptación al estrés ambiental, resistencia a metales y supervivencia en ambientes extremos, en los plásmidos de las cepas bacterianas *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ510 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506 aisladas de aguas ácidas de zonas mineras altoandinas de Cerro de Pasco, Perú.

#### 3.2. Objetivos

##### 3.2.1. Objetivo general

Caracterizar comparativamente los genomas de los plásmidos de las cepas *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ510 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506 aisladas de aguas ácidas de zonas mineras de Cerro de Pasco, Perú.

##### 3.2.2. Objetivos específicos

1. Purificar plásmidos de ambas cepas de *Acidithiobacillus*.
2. Secuenciar completamente los plásmidos de ambas cepas.
3. Analizar las secuencias genómicas completas de dichos plásmidos, mediante herramientas bioinformáticas, para determinar secuencias codificantes y predecir su función.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Cepas de *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ510 y *At. ferrooxidans* PQ506

El Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología cuenta con cepas de *At. ferrivorans* y *At. ferrooxidans* aisladas de zonas mineras altoandinas de nuestro país. Estas fueron identificadas mediante el análisis de la secuencia del gen rRNA 16S. De ellas, se seleccionaron las cepas PQ510 y PQ506 para el secuenciamiento total de sus plásmidos.

### 4.2. Aislamiento de plásmidos de *Acidithiobacillus*

Se preparó un cultivo joven y se extrajo el DNA plasmídico.

Para el aislamiento de los plásmidos se sembraron 10 ml de cada una de las cepas con 3 semanas de crecimiento en 50 ml de medio 9K a pH 1.7, para obtener células jóvenes. Luego se inoculó 20 ml del cultivo obtenido en 250 ml de 9K para la obtención de suficiente biomasa para la extracción (Chisholm 1998).

Las células se cosecharon a 7 000 rpm por 10 min y a una temperatura de 10°C. Para la extracción de plásmidos se utilizó el protocolo de PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen™). Finalmente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 0.5X y se visualizaron las bandas en un fotodocumentador luego de teñir los geles con una solución de bromuro de etidio (0.5µg/ml) por 45 seg. Como marcador de tamaño molecular se usó el 1Kb DNA Ladder (Promega).

El DNA se cuantificó por duplicado y se verificó su pureza usando un Nanodrop® de ThermoScientific. Para enviar a secuenciar el DNA plasmídico extraído, éste cumplía con los siguientes requerimientos mínimos de calidad establecidos: concentración >1µg/µl y pureza A260/280 >1,7.

### 4.3. Secuenciamiento y análisis bioinformático

Se envió a secuenciar el DNA plasmídico de las cepas PQ510 y PQ506 a la Empresa MacroGen Korea, mediante tecnología *Next Generation Sequencing* (NGS) HiSeq2500 de Illumina.

#### 4.3.1. Evaluación de la calidad de las secuencias

La calidad de las secuencias enviadas por la empresa MacroGen Korea fue evaluada mediante el programa de acceso libre FastQC (Babraham Institute Bioinformatics) (Andrews, 2014). Este programa genera un valor o *score* de calidad de las secuencias (de cada *read*) basándose en varios criterios: 1) la calidad de cada base nitrogenada asignada a las secuencias, 2) la calidad promedio de las secuencias, 3) proporción de cada una de las bases en la secuencia (se espera similar proporción de A y T, así como de G y C, las diferencias no deben superar el 10%), 4) contenido de GC a lo largo de la secuencia, 5) contenido de bases N (no asignadas) en la secuencia, 6) distribución de los tamaños de las secuencias, 7) proporción de secuencias duplicadas, 8) secuencias sobrerrepresentadas, 9) contenido de adaptadores, entre otros.

#### 4.3.2. Ensamblaje de las secuencias

Las secuencias fueron ensambladas *de novo*, cuyo principio es la suposición que los fragmentos de DNA altamente similares se originan de la misma posición dentro del genoma. De esta manera, la similitud entre secuencias de DNA se usa para conectar fragmentos individuales (*reads*) en secuencias contiguas más largas, denominadas *contigs* (secuencias consenso obtenidas a partir del ensamblaje de los *reads*). Para el ensamblaje se usó el programa Velvet versión 1.1 (Zerbino y Birney, 2008) y Unicycler (Wick et al., 2017). Los *contigs* resultantes se ensamblaron con los *softwares* CAP3 (Huang y Madan, 1999) y SSPACE (Boetzer et al., 2011), que determinan el orden, distancia y orientación de los *contigs* para combinarlos formando los *supercontigs* o *scaffolds*. El ensamblaje terminó al cerrar las secuencias genómicas de los plásmidos.

#### 4.3.3 Anotación de las secuencias

Luego se realizó la anotación de los genomas plasmídicos, que es la identificación de sus principales características. Se predijeron los genes codificantes, asignándoles un nombre y función biológica según su similitud con aquellos consignados en las bases de datos. Se buscaron marcos de lectura abierta (ORF) con los programas Prokka (Seemann,

2014), ORF Finder (Tatusov R. y Tatusov T., 2015). Estos comparan las secuencias totales de los plásmidos con aquellas disponibles en las bases de datos mediante el uso de los programas BlastN y BlastP (Altschul et al., 1990). Las búsquedas de similitud se realizaron empleando BlastX contra las bases de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) y UniProt (<https://www.uniprot.org/>), así como de RAST (Rapid Annotation using Subsystems Technology) (<http://rast.nmpdr.org/>), tomando en cuenta los ORF's que presentaban un porcentaje de identidad mayor al 30 % y un *E-value* menor a  $e^{-05}$ . También se usó GeneMarkS (Besemer et al., 2001) (<http://exon.gatech.edu/GeneMark/>) que predice el inicio de la traducción de genes procarióticos, incluyendo los localizados en plásmidos. Las categorías funcionales COG se asignaron usando eggNOG (*evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups Cluster*) (Huerta-Cepas et al., 2018) (<http://eggno-mapper.embl.de/>).

Para el análisis se consideraron los siguientes criterios:

- 1.- El alineamiento de varias secuencias de similar función en procariotas.
- 2.- Presencia de dominios de proteínas.
- 3.- Alineamiento con plásmidos de cepas biolixivantes o función metabólica relacionada.

Las secuencias que presentaron dominios fueron corroboradas con SmartGenomes

([http://smart.embl.de/smart/set\\_mode.cgi?GENOMIC=1](http://smart.embl.de/smart/set_mode.cgi?GENOMIC=1)).

Se han usado los siguientes conceptos de **evidencias** que apoyan la existencia de proteínas en la base de datos UniProtKB (The UniProt Consortium, 2019), los cuales son los siguientes:

#### **Evidencia experimental a nivel de proteínas:**

Indica que hay evidencia experimental clara de la existencia de la proteína, como secuenciamiento parcial o completo de Edman, identificación por espectrometría de masas, rayos X o estructura NMR, buena calidad de interacción proteína-proteína, o detección de la proteína por anticuerpos.

**Evidencia experimental a nivel de transcripto:**

Indica que la existencia de la proteína no ha sido estrictamente probada, pero que los datos de expresión (como la existencia de cDNA, RT-PCR o Northern blots) evidencian la existencia de un transcripto.

**Proteína inferida por homología:**

Indica que la existencia de una proteína es probable debido a la clara existencia de ortólogos en especies cercanamente relacionadas.

**Proteína predicha:**

No hay evidencia a nivel de proteína, transcripto ni homología.

**Proteína incierta:**

Indica que no es segura la existencia de la proteína.

#### 4.3.4 Mapa circular de los plásmidos

El mapa circular de los plásmidos fue creado con el *software* CGview (Stothard y Wishart, 2005; Grant y Stothard, 2008) ([http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview\\_server/](http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview_server/)).

#### 4.3.5 Análisis del %GC de los plásmidos

La determinación del % de GC de los plásmidos se hizo usando el software libre editor de secuencias de DNA WebDSVla 2.0 (<http://www.molbiotools.com/WebDSV/>).

#### 4.3.6 Análisis comparativo del operón *arsADCRB*

El análisis comparativo del operón *arsADCRB* encontrado en el plásmido pAfPQ506-1 se hizo usando el servidor de anotación RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (<http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>), que es un servicio totalmente

automatizado de anotación de genomas bacterianos y de arqueas, con alta calidad (Aziz et al., 2008; Overbeek et al., 2014). La secuencia de los genes *arsA*, *arsD*, *arsC*, *arsR* y *arsB*, se compararon con 63 plásmidos y 41 genomas cromosomales de bacterias procedentes de ambientes mineros, suelos, lagunas, océanos y algunos de origen clínico, que presentaban resistencia al arsénico. Dichos plásmidos y genomas fueron anotados y reanotados en el servidor RAST para efectuar el análisis comparativo con énfasis en la presencia de genes del operón de resistencia al arsénico. Se construyó un árbol de distancias genéticas a partir de alineamientos de las secuencias de plásmidos con el programa Mauve (Darling et al., 2004).

El análisis comparativo de los plásmidos más relacionados con los genes de resistencia al arsénico fue realizado con BlastN y graficado para su visualización con el programa *EasyFig* (Sullivan et al., 2011).

Los genes y proteínas *arsC* más conservados de los plásmidos que presentan resistencia al arsénico, fueron extraídos con BlastN y BlastP (Chen et al., 2015). Las secuencias fueron alineadas y editadas para generar el árbol de máxima verosimilitud con el programa Mega 7 (Kumar et al., 2016; Larkin et al., 2007). El análisis filogenético de máxima verosimilitud de genes y proteínas ArsC fue ejecutado con un *bootstrap* de 1000 y el modelo LG (Le y Gascuel, 2008) que es una matriz de reemplazo de aminoácidos mejorada, útil para la filogenia de proteínas. Los árboles fueron editados con los programas FigTree y iTOL (Rambaut, 2018; Letunic et al., 2006).

#### 4.3.7 Búsqueda de elementos genéticos móviles

La búsqueda de elementos genéticos móviles en los plásmidos se hizo mediante BlastN contra las bases de datos de NCBI y de EMBL, y corroborando los resultados en <http://www.mobilomics.cl/about.html>.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análisis bioinformático de los plásmidos pAfPQ510-1, pAfPQ510-2 y pAfPQ510-3 de *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ510

El DNA plasmídico extraído cumplió con las exigencias de calidad y fue secuenciado por el sistema HiSeq2500 de Illumina®. A estas secuencias recibidas se les realizó un análisis de calidad con el programa FastQC, resultando de buena calidad (Fig. 4).

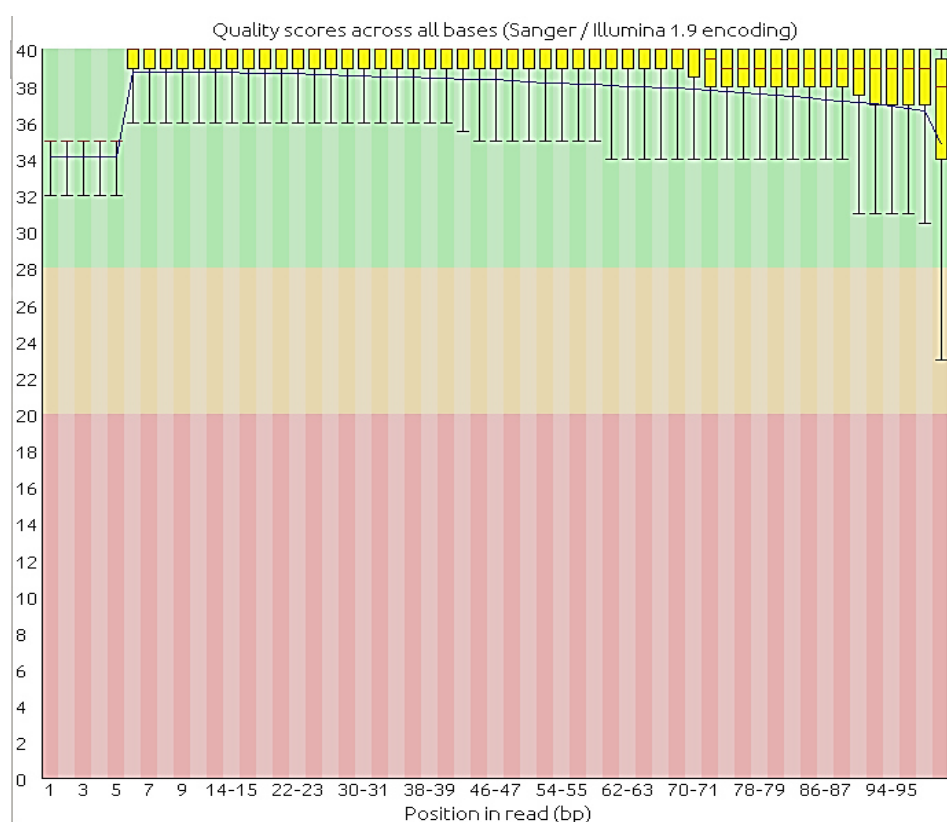


Fig. 4. Calidad de las secuencias crudas recibidas del DNA plasmídico de *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ510. Esta imagen presenta tres sectores, el de **color verde es de calidad buena**, el anaranjado aceptable y el rojo es de mala calidad. Las barras en amarillo corresponden al rango de 25 a 75% de las secuencias, su proyección en líneas corresponden del 10 al 90% de las secuencias. La línea es la calidad media de las secuencias.

Se hizo un ensamblaje *de novo* mediante el paquete de programas Velvet (Zerbino, 2010) y Unicycler (Wick et al., 2017), determinándose un tamaño de 28369 pb para el plásmido pAfPQ510-1, 16745 pb para el plásmido pAfPQ510-2 y 12365 pb para el plásmido pAfPQ510-3 (Figs. 5, 6 y 7). Las características generales de estos plásmidos se muestran en las Tablas 2, 3 y 4.



Tabla 2. Características generales del plásmido pAfPQ510-1

<b>pAfPQ510-1</b>	
Tamaño	28369 pb
Contenido de GC	52.90%
Genes codificantes de proteínas	41
Proteínas con función asignada	13
Proteínas hipotéticas	28

Estas características se determinaron usando los *softwares*, ORFfinder, BlastP GeneMarkS, Prokka y RAST (4.3.3.), y el %GC con WebDSVla 2.0 (<http://www.molbiotools.com/WebDSV/>).

Tabla 3. Características generales del plásmido pAfPQ510-2

<b>pAfPQ510-2</b>	
Tamaño	16745 pb
Contenido de GC	56.40%
Genes codificantes de proteínas	21
Proteínas con función asignada	6
Proteínas hipotéticas	15

Estas características se determinaron usando los *softwares*, ORFfinder, BlastP GeneMarkS, Prokka y RAST (4.3.3.), y el %GC con WebDSVla 2.0 (<http://www.molbiotools.com/WebDSV/>).

Tabla 4. Características generales del plásmido pAfPQ510-3

<b>pAfPQ510-3</b>	
Tamaño	12365 pb
Contenido de GC	51.70%
Genes codificantes de proteínas	15
Proteínas con función asignada	5
Proteínas hipotéticas	10

Estas características se determinaron usando los *softwares*, ORFfinder, BlastP GeneMarkS, Prokka y RAST (4.3.3.), y el %GC con WebDSVla 2.0 (<http://www.molbiotools.com/WebDSV/>).

### 5.1.1 Anotación de los plásmidos pAfPQ510-1, pAfPQ510-2 y pAfPQ510-3 de *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ510

El análisis genómico *in silico* de estos plásmidos reveló la presencia de secuencias codificantes (CDS) de proteínas. Los genes de proteínas con función asignada encontrados se detallan en las tablas 5, 6 y 7, y su localización en los plásmidos se muestra en las figuras 5, 6 y 7, respectivamente.

Tabla 5. Secuencias codificantes encontradas en el plásmido pAfPQ510-1

DESIGNACIÓN DEL ORF	PRODUCTO PROTÉICO	E value	Identidad (%)	Organismo cercano
Hipotético	Proteína hipotética con dominio DUF4158.	0.038	43.66	Bacteria del orden Rhizobiales
TinR	Resolvasa/Integrasa TinR protein. Categoría funcional COG = L (replicación, recombinación y reparación).	7.00E-64	79.67	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Burkholderia</i> sp.
Hipotético	Proteína hipotética. Similar a la proteína GtrA-like. Categoría funcional COG = S (función desconocida).	1.70E-90	100.00	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> SS3
Acife_3019 (crtI)	15-cis-fitoeno desaturasa. Categoría funcional COG = H (metabolismo de coenzimas).	0	98.60	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
RmlD	dTDP-4-dehidroramnosa reductasa. Categoría funcional COG = GM (G, metabolismo y transporte de carbohidratos, y M, biogénesis de pared celular/membrana/envoltura).	0	94.01	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
Hipotético	Proteína hipotética similar a gen ortólogo con producto proteína de transporte de protones acoplado a hidrólisis de ATP. Categoría funcional COG = C (producción y conversión de energía).	0.00E+00	89.46	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
Hipotético	Proteína hipotética. Posible oxidorreductasa. Similar a gen ortólogo con producto reductasa deshidrogenasa de cadena corta. Categoría funcional COG = S (función desconocida).	1.30E-153	89.80	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> SS3
DprE1	Putativa decaprenilfosforil-beta-D-ribosa oxidasa. Similar a gen ortólogo con producto oxidasa ligada a Fad. Categoría funcional COG = C (producción de energía y conversión).	6.00E-27	57.45	<i>Acidithiobacillus caldus</i> y <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
Hipotético	Proteína hipotética. Posible Decaprenil-fosfato fosforibosiltransferasa. Similar a gen ortólogo con producto UbiA prenilttransferasa. Categoría funcional COG = H (transporte y metabolismo de coenzimas).	1.00E-24	79.22	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> y <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
XerD	Tirosina recombinasa. Similar a proteína de replicación y a gen ortólogo con producto proteína reguladora de fimbria Tipo 1. Categoría funcional COG = L (replicación, recombinación y reparación).	4.00E-119	82.59	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>

Continuación: Tabla 5. Secuencias codificantes encontradas en el plásmido pAfPQ510-1

Hipotético	Proteína hipotética. Categoría funcional COG = S (función desconocida).	8.00E-29	87.50	<i>Acidithiobacillus albertensis</i>
Hipotético	Proteína hipotética. Similar a gen ortólogo con producto integrasa. Categoría funcional COG = L (replicación, recombinación y reparación).	4.00E-55	96.51	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> y <i>Oceanimonas</i> sp.
Hipotético	Proteína hipotética.	6.00E-52	95.24	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
Hipotético	Proteína hipotética. Similar a gen ortólogo con producto proteína con dominio IrrE N-terminal-like. Categoría funcional COG = E (transporte y metabolismo de aminoácidos).	5.80E-24	53.80	<i>Shinella</i> sp. MEC087 y <i>Methylobacter tundripaludum</i>
Hipotético	Proteína hipotética. Categoría funcional COG = S (función desconocida).	6.70E-55	53.60	<i>Methylobacter tundripaludum</i> (ATCC BAA-1195 / DSM 17260 / SV96)
HU	Proteína HU de unión a DNA. Similar a gen ortólogo con producto protéico de la familia similar a histona bacteriana. Categoría funcional COG = L (replicación, recombinación y reparación).	6.00E-15	55.00	<i>Acidithiobacillus</i> y <i>Desulfovibrio alkalitolerans</i>
Hipotético	Proteína hipotética.	2.00E-40	93.06	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
Hipotético	Proteína hipotética.	3.80E-01	45.45	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK
RepB	Proteína iniciadora de la replicación. Categoría funcional COG = L (replicación, recombinación y reparación).	0	94.87	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> y <i>Polaromonas</i> sp.
ParB	Proteína de segregación ( <i>partition</i> ). Categoría funcional COG = D (control de ciclo celular, división celular, segregación).	1.00E-40	95.71	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
Soj	ATPasa de segregación cromosomal. Similar a gen ortólogo con producto ATPasa de la familia AAA. Categoría funcional COG = D (control de ciclo celular, división celular, segregación).	4.00E-134	91.87	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Tepidicella xavieri</i> y <i>Xantomonas axonopodis</i>
Hipotético	Proteína hipotética.	2.90E+00	50.00	<i>Mycobacterium xenopi</i> 3993
Hin	DNA-invertasa. Similar a gen ortólogo con producto resolvasa. Categoría funcional COG = L (replicación, recombinación y reparación).	8.00E-130	99.46	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
Hipotético	Proteína hipotética.	2.00E-36	95.31	<i>Acidithiobacillus</i>
RelE2	Toxina RelE2. Categoría funcional COG = S (función desconocida).	2.00E-60	94.85	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> ATCC 19377
Hipotético	Proteína hipotética.	0	94.77	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
Hipotético	Proteína hipotética.	2.20E-22	59.30	<i>Methylocaldum marinum</i>
Hipotético	Proteína hipotética.	7.00E-02	40.40	<i>Tritonibacter horizontalis</i>
Hipotético	Proteína hipotética.	3.00E-43	89.33	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
Antitoxin MqsA	MqsA. Similar a gen ortólogo con producto antitoxina, componente del sistema toxina-antitoxina bacteriana MqsA. Categoría funcional COG = K (transcripción)	2.00E-78	80.45	<i>Azotobacter chroococcum</i>
Toxina MqsR (mRNA interferase)	MqsR. Similar a gen ortólogo con producto regulador de motilidad por <i>quorum-sensing</i> , toxina de MqsA. Categoría funcional COG = S (función desconocida)	2.00E-38	75.00	<i>Sterolibacterium denitrificans</i>
Hipotético	Proteína hipotética con dominio relajasa movilización nucleasa. Categoría funcional COG = U (tráfico intracelular, secreción, transporte vesicular).	0.00E+00	54.38	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>

Continuación: Tabla 5. Secuencias codificantes encontradas en el plásmido pAfPQ510-1

Hipotético	Proteína hipotética. Similar a proteína de movilización MobB.	6.00E-22	51.09	<i>Leptospirillum ferriphilum</i>
Hipotético	Proteína hipotética.	4.00E-05	48.89	<i>Arsenophonus nasoniae</i>
Hipotético	Proteína hipotética con dominio CbiA. Similar a gen ortólogo con producto CobQ/CobB/MinD/ParA con dominio de unión a nucleótido. Categoría funcional COG = D (control de ciclo celular, división celular, segregación).	4.80E-22	30.20	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4 / LMG 22486 y <i>Burkholderia cepacia</i> R1808
Hipotético	Proteína hipotética.	1.50E-04	23.90	<i>Acidithiobacillus caldus</i>
Hipotético	Proteína hipotética con dominio PIN.	1.00E-61	80.58	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
Hipotético	Proteína hipotética. Similar a gen ortólogo con producto protéico con dominio similar a SpoVT / AbrB. Categoría funcional COG = K (transcripción).	5.00E-39	81.25	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> y <i>Leptospirillum ferrooxidans</i>
Hipotético	Proteína hipotética. Similar a gen ortólogo con producto CopG antitoxin of type II toxin-antitoxin system. Categoría funcional COG = S (función desconocida).	7.00E-53	98.81	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y <i>Desulfomicrobium maculatum</i>
Hipotético	Proteína hipotética. Similar a gen ortólogo con producto toxina ribonucleasa, BrnT, del sistema toxina-antitoxina tipo II. Categoría funcional COG = S (función desconocida).	5.00E-67	94.12	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y <i>Desulfomicrobium maculatum</i>
Hipotético	Proteína hipotética con dominio WGR.	3.00E-31	70.51	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>

Para la anotación se usaron los programas ORFfinder, Prokka, RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) y GenMark (<http://exon.gatech.edu/GeneMark/>), los análisis de similaridad se realizaron usando BlastP contra las bases de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) y UniProt (<https://www.uniprot.org/>). La categoría funcional COG se asignó usando eggNOG (*evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups Cluster*) (Huerta-Cepas et al., 2018) (<http://eggno-mapper.embl.de/>).

Tabla 6. Secuencias codificantes encontradas en el plásmido pAfPQ510-2

DESIGNACIÓN DEL ORF	PRODUCTO PROTÉICO	E value	Identidad (%)	Organismo cercano
YeeA	Sistema de modificación/restricción Tipo II, subunidad metilasa YeeA. Categoría funcional COG = V (mecanismos de defensa).	0	61.90	<i>Thermomonas haemolytica</i> y <i>Lysobacter concretionis</i>
XerD	Tirosina recombinasa. Similar a gen ortólogo <i>fimE</i> con producto proteína reguladora de fimbria tipo 1. Categoría funcional COG = L (replicación, recombinación y reparación).	2.00E-148	87.45	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
Hipotético	Proteína hipotética con dominio hélice-hélice de unión a DNA CopG. Categoría funcional COG = S (función desconocida).	1.00E-42	100.00	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> y <i>Kushneria aurantia</i>
RelE	Toxina RelE de la familia RelE/ParE. Categoría funcional COG = DJ (D=control de ciclo celular, división celular, segregación; J= traducción).	5.00E-54	97.75	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> y <i>Thioalkalivibrio sulfidophilus</i>
Hipotético	Proteína hipotética. Probable transposasa.	2.90E+00	37.50	<i>Deinococcus</i>
Hipotético	Proteína hipotética. Probable RepA. Similar a gen ortólogo con producto Primasa C terminal 1 (PriCT-1). Categoría funcional COG = KT (K=Transcripción, y T = mecanismo de transducción de señal).	0.00E+00	88.39	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> , <i>Thiobacillus</i> sp., <i>Aeromonas salmonicida</i>

Continuación: Tabla 6. Secuencias codificantes encontradas en el plásmido pAfPQ510-2

Hipotético	Proteína hipotética.	4.00E-32	88.71	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
Hipotético	Proteína hipotética. Similar a gen ortólogo con producto regulador transcripcional. Categoría funcional COG = K (transcripción).	2.00E-49	100.00	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
Hipotético	Proteína hipotética. Similar a la familia de proteínas YeeE/YedE.	7.30E-1	34.52	<i>Curvibacter</i> sp. PAE-UM
Hipotético	Proteína hipotética.	2.00E-43	100.00	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
HU	Proteína HU de unión a DNA. Similar a gen ortólogo con producto subunidad $\beta$ de factor de integración de hospedero. Esta proteína funciona en recombinación genética así como en el control transcripcional y traduccional. Categoría funcional COG = K (transcripción).	9.00E-71	100.00	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y <i>Acidithiobacillus caldus</i>
Hipotético	Proteína hipotética.	6.00E-50	100.00	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
MarR	Regulador transcripcional de la familia MarR. Similar a gen ortólogo con producto regulador transcripcional. Categoría funcional COG = K (transcripción).	7.00E-35	100.00	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
Hipotético	Proteína hipotética.	1.00E-67	100.00	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
MobA	Proteína A de movilización. Similar a gen ortólogo con producto proteico de la familia MobA/MobL. Categoría funcional COG = L (replicación, recombinación y reparación).	0	53.30	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> y <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
Hipotético	Proteína hipotética. Similar a proteína quinasa serina/treonina	4.90E-02	54.40	<i>Nostoc punctiforme</i>
Hipotético	Proteína hipotética con dominio YfbU. Categoría funcional COG = S (función desconocida).	9.90E-131	81.70	<i>Thiobacillus intermedius</i>
Hipotético	Proteína hipotética. Similar a gen ortólogo con producto sistema toxina-antitoxina tipo II de la familia Phd/YefM. Categoría funcional COG = D (control de ciclo celular, división celular, segregación).	2.00E-18	43.90	Candidatus <i>Competibacteraceae</i> y <i>Kyrpidia tusciae</i>
Hipotético	Proteína hipotética. Similar a sistema toxina-antitoxina de la familia RelE/ParE. Similar a gen ortólogo con producto Represor Traduccional Citotóxico de sistema toxina-antitoxina. Categoría funcional COG = DJ (D=control de ciclo celular, división celular, segregación; J= traducción).	9.00E-32	64.77	<i>Methylogaea oryzae</i> y <i>Geobacter</i> sp.
Hipotético	Proteína hipotética similar a regulador transcripcional de la familia LytTR	3.00E+00	43.20	<i>Aquiflexum balticum</i>
Hipotético	Proteína hipotética.	1.00E-21	60.00	<i>Burkholderia</i> sp. OK233

Para la anotación se usaron los programas ORFfinder, Prokka, RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) y GenMark (<http://exon.gatech.edu/GeneMark/>), los análisis de similaridad se realizaron usando BlastP contra las bases de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) y UniProt (<https://www.uniprot.org/>). La categoría funcional COG se asignó usando eggNOG (*evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups Cluster*) (Huerta-Cepas et al., 2018) (<http://eggno-mapper.embl.de/>).

Tabla 7. Secuencias codificantes encontradas en el plásmido pAfPQ510-3

DESIGNACIÓN DEL ORF	PRODUCTO PROTÉICO	E value	Identidad (%)	Organismo cercano
Hipotético	Proteína hipotética con dominio F-box.	6.70E+00	42.00	<i>Exidia glandulosa</i> HHB12029
Hipotético	Proteína hipotética similar a pirrolina-5-carboxilato reductasa	5.50E+00	35.85	bacteria KA00344 del orden Bacteroidales
MbeA	DNA relajasa MbeA. Similar a gen ortólogo con producto relajase movilización nucleasa. Categoría funcional COG = S (función desconocida).	1.00E-94	46.20	<i>Desulfobacter hydrogenophilus</i>
Hipotético	Proteína hipotética similar a MobC de relajosoma movilización de plásmido.	1.00E-17	52.87	<i>Halomonas smyrnensis</i>
Hipotético	Proteína hipotética.	1.00E-36	85.92	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
Hipotético	Proteína hipotética.	3.00E-179	82.76	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Pseudomonas stutzeri</i>
ParE	Toxina del sistema toxina-antitoxina RelE/ParE. Similar a gen ortólogo con producto toxina del módulo de adicción RelE/StbE. Categoría funcional COG = S (función desconocida).	2.00E-69	98.11	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> y <i>Burkholderia ferrariae</i> .
Phd	Antitoxina Phd.	1.80E-61	62.00	<i>Ferroplasma</i> sp. Z-31
Hipotético	Proteína hipotética con dominio HTH.	3.00E-92	94.29	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
Hipotético	Proteína hipotética.	8.00E-48	100.00	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
Hipotético	Proteína hipotética con dominio Tir. Similar a gen ortólogo con producto proteico con dominio TIR. Categoría funcional COG = S (función desconocida).	4.00E-95	53.52	<i>Ruminococcus</i> sp. AM33-14 y <i>Proteiniborus ethanoligenes</i>
Hipotético	Proteína hipotética.	3.00E-162	72.15	<i>Magnetovibrio blakemorei</i>
SinR	Regulador transcripcional tipo HTH. Similar a gen ortólogo con producto regulador transcripcional. Categoría funcional COG = K (transcripción).	4.30E-41	97.20	Candidatus <i>Accumulibacter</i> sp. SK-02
Hipotético	Proteína hipotética. Similar a gen ortólogo con producto deoxirribonucleasa tipo II específica de sitio. Categoría funcional COG = L (replicación, recombinación y reparación).	2.00E-162	88.40	<i>Acidihalobacter ferrooxidans</i> y <i>Geobacter daltonii</i>
DpnA	Enzima de modificación DNA metiltransferasa específica de sitio. Similar a gen ortólogo con producto DNA metilasa. Categoría funcional COG = L (replicación, recombinación y reparación).	1.00E-175	92.52	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Xanthomonas campestris</i>

Para la anotación se usaron los programas ORFfinder, Prokka, RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) y GenMark (<http://exon.gatech.edu/GeneMark/>), los análisis de similaridad se realizaron usando BlastP contra las bases de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) y UniProt (<https://www.uniprot.org/>). La categoría funcional COG se asignó usando eggNOG (*evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups Cluster*) (Huerta-Cepas et al., 2018) (<http://eggno-mapper.embl.de/>).



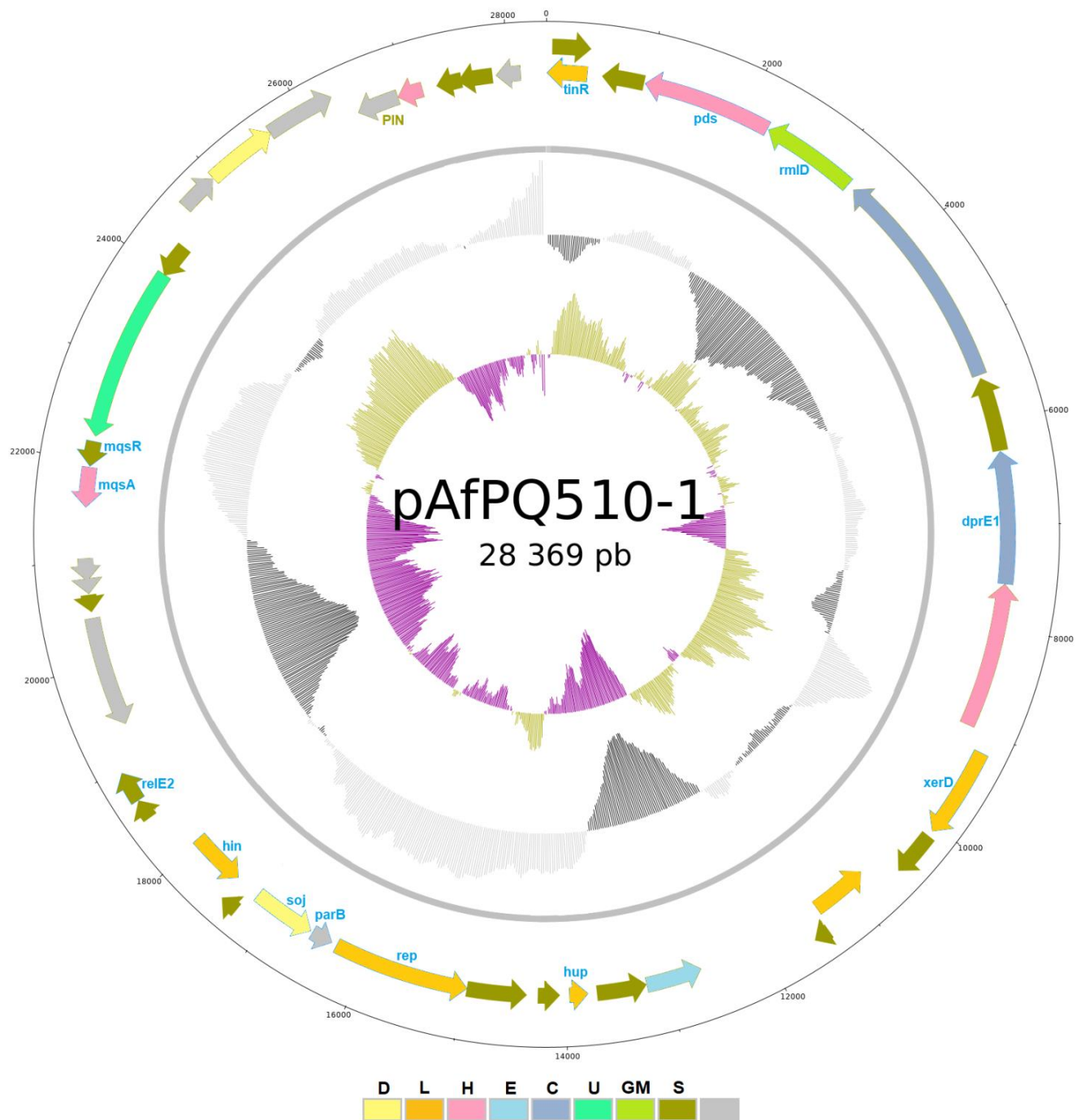


Fig. 5. Características del plásmido pAfPQ510-1 de 28369 pb de *At. ferrivorans* PQ510. Del centro hacia afuera: El primer anillo es la asimetría de GC (GCskew), que se indica con sombreado color *beige* y violeta, donde el *beige* indica un GCskew positivo y el violeta uno negativo. El segundo anillo es el contenido de G+C que se indica con sombreado negro y gris, donde el negro representa un contenido más alto y el gris uno más bajo de G+C que el promedio del plásmido. El tercer anillo representa la secuencia de DNA plasmídico. Los anillos 4 y 5 muestran la predicción de genes codificantes de proteínas sobre la cadena *forward* y *reverse*, respectivamente. Los genes predichos se indican con flechas de un color correspondiente a una categoría funcional eggNOG (*evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups Cluster*) (Huerta-Cepas et al., 2018) indicada en la leyenda. D=división celular y segregación, L=replicación, recombinación y reparación, H=metabolismo de coenzimas, E=metabolismo y transporte de aminoácidos, C=producción y conversión de energía, U= tráfico intracelular, secreción, transporte vesicular, GM=G, metabolismo y transporte de carbohidratos, y M, biogénesis de pared celular/membrana/envoltura, S=función desconocida. Los genes de proteínas hipotéticas sin categoría funcional están representados con flechas grises. El anillo 6 muestra el número de nucleótidos del plásmido marcados por cada 1000.

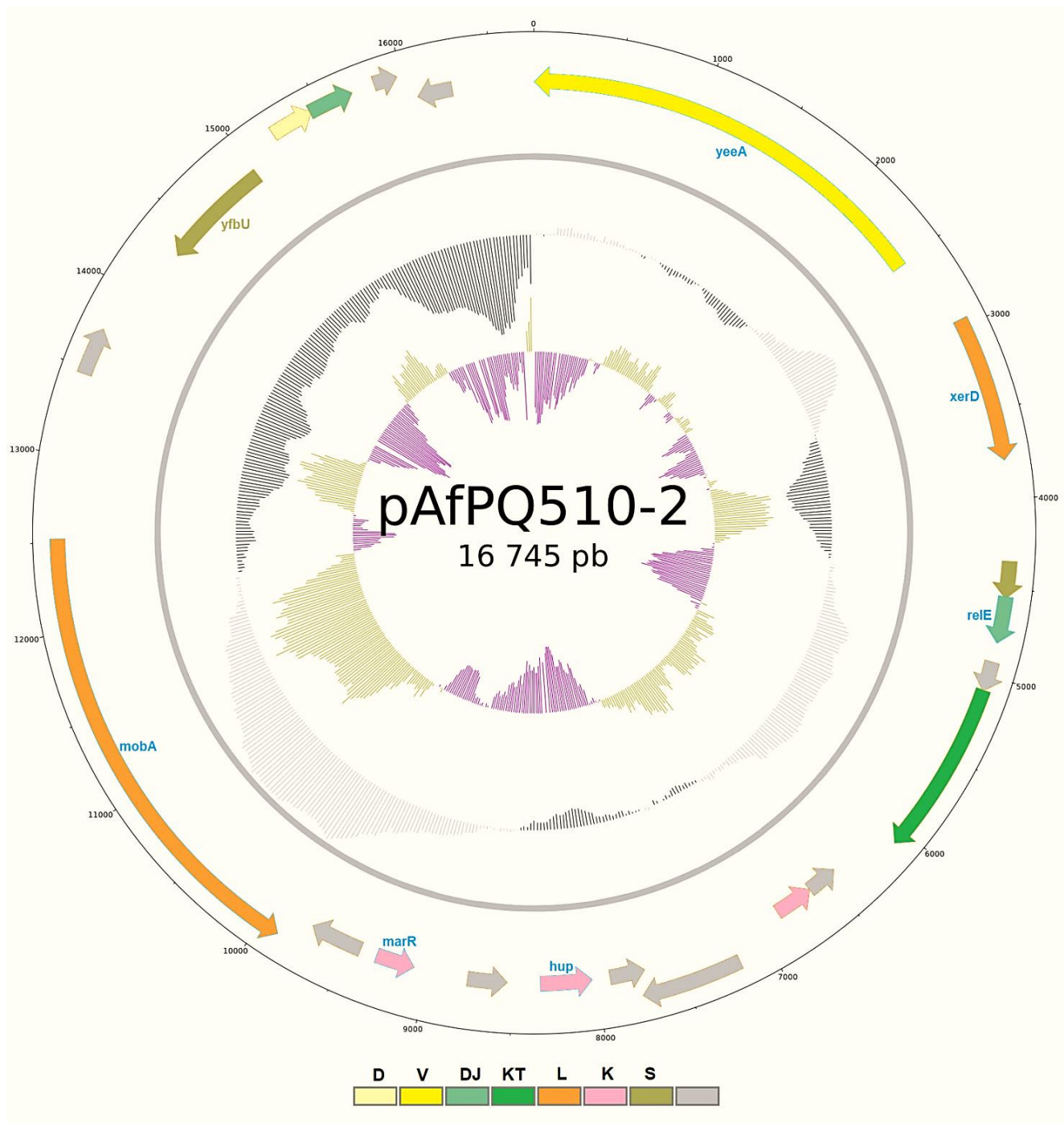


Fig. 6. Características del plásmido pAfPQ510-2 de 16745 pb de *At. ferrivorans* PQ510. Del centro hacia afuera: El primer anillo es la asimetría de GC (GCskew), que se indica con sombreado color *beige* y violeta, donde el *beige* indica un GCskew positivo y el violeta uno negativo. El segundo anillo es el contenido de G+C que se indica con sombreado negro y gris, donde el negro representa un contenido más alto y el gris uno más bajo de G+C que el promedio del plásmido. El tercer anillo representa la secuencia de DNA plasmídico. Los anillos 4 y 5 muestran la predicción de genes codificantes de proteínas sobre la cadena *forward* y *reverse*, respectivamente. Los genes predichos se indican con flechas de un color correspondiente a una categoría funcional eggNOG (*evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous GroupsCluster*) (Huerta-Cepas et al., 2018) indicada en la leyenda. D=división celular y segregación; V=mecanismos de defensa; DJ= D, división celular y segregación, y J, traducción, estructura y biogénesis ribosomal; KT= K, transcripción y T, mecanismo de transducción de señal; L= replicación, recombinación y reparación; K= transcripción; S=función desconocida. Los genes de proteínas hipotéticas sin categoría funcional están representados con flechas grises. El anillo 6 muestra el número de nucleótidos del plásmido marcados por cada 1000.



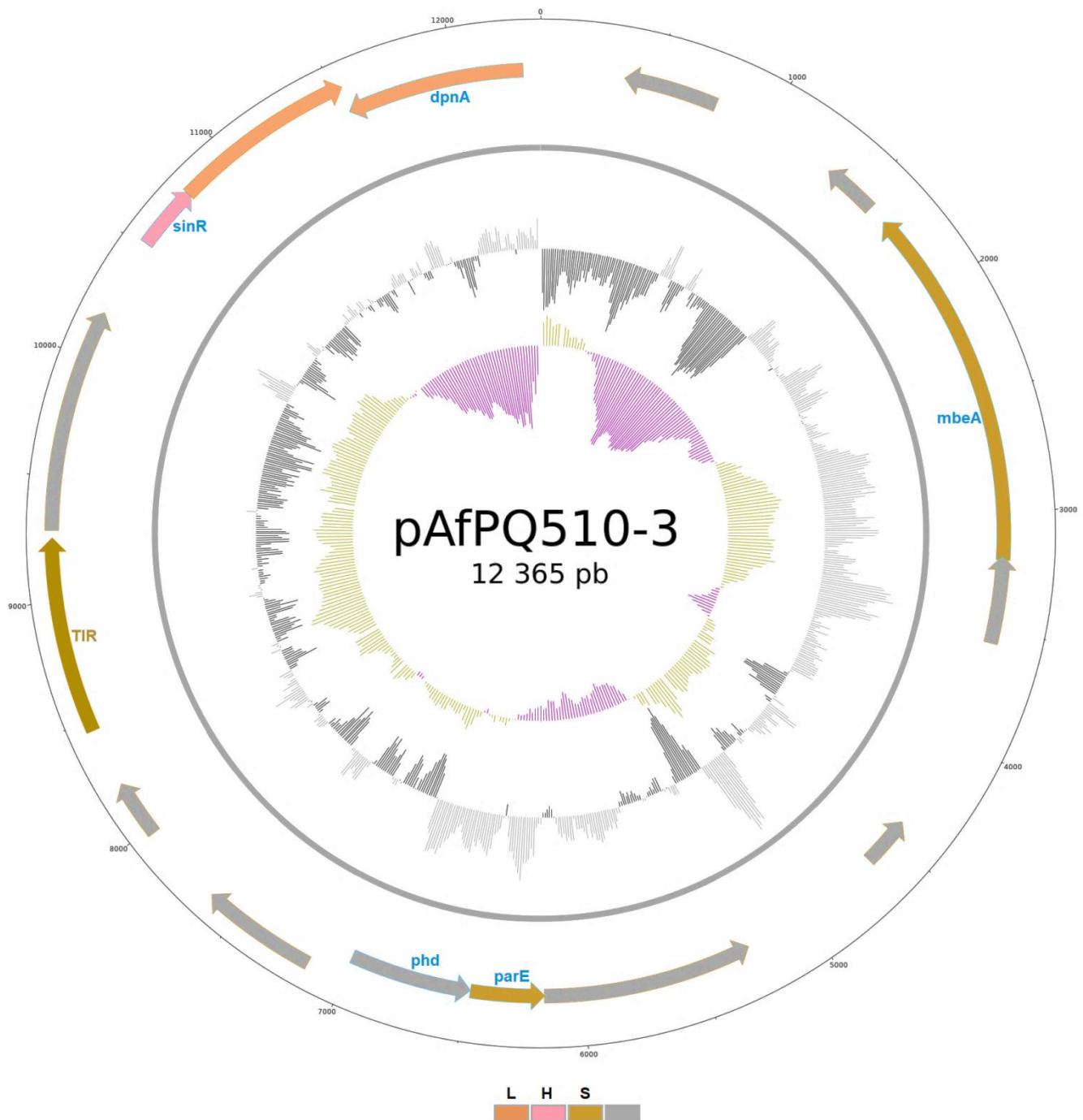


Fig. 7. Características del plásmido pAfPQ510-3 de 12365 pb de *At. ferrivorans* PQ510. Del centro hacia afuera: El primer anillo es la asimetría de GC (GCskew), que se indica con sombreado color *beige* y violeta, donde el *beige* indica un GCskew positivo y el violeta uno negativo. El segundo anillo es el contenido de G+C que se indica con sombreado negro y gris, donde el negro representa un contenido más alto y el gris uno más bajo de G+C que el promedio del plásmido. El tercer anillo representa la secuencia de DNA plasmídico. Los anillos 4 y 5 muestran la predicción de genes codificantes de proteínas sobre la cadena *forward* y *reverse*, respectivamente. Los genes predichos se indican con flechas de un color correspondiente a una categoría funcional eggNOG (*evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous GroupsCluster*) (Huerta-Cepas et al., 2018) indicada en la leyenda. D=división celular y segregación, L=replicación, recombinación y reparación, H=metabolismo de coenzimas, S=función desconocida. Los genes de proteínas hipotéticas sin categoría funcional están representados con flechas grises. El anillo 6 muestra el número de nucleótidos del plásmido marcados por cada 1000.

5.2 Análisis bioinformático del plásmido pAfPQ506-1 de *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506

El DNA plasmídico extraído cumplió con las exigencias de calidad (Fig. 8) y fue secuenciado por el sistema HiSeq2500 de Illumina®. A las secuencias recibidas se les realizó un análisis de calidad con el programa FastQC, resultando de buena calidad (Fig. 9).

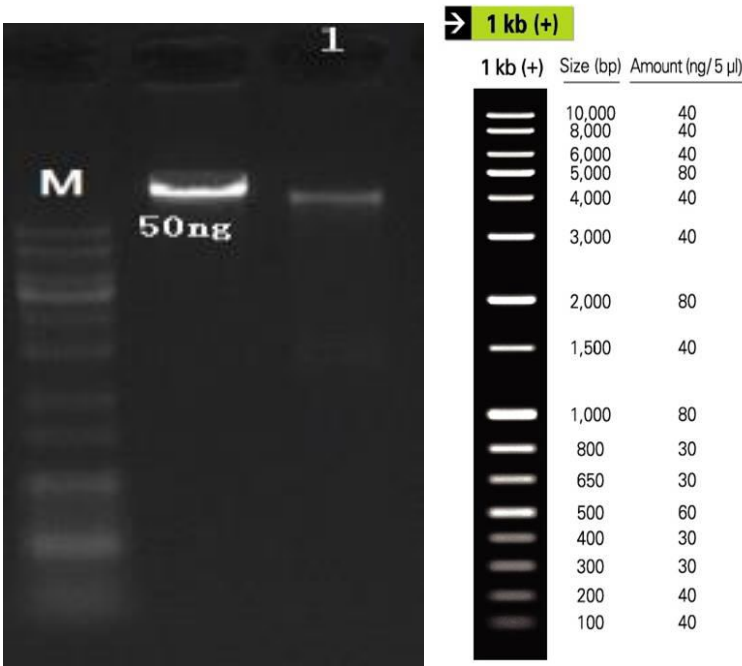


Figura 8. DNA plasmídico extraído de la cepa *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506 enviado a secuenciar. Electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100V, 30 minutos. Carril 1: DNA con una concentración de 20ng/µl. No se observa *smearing*. A la derecha se muestra los tamaños de los fragmentos del marcador ladder usado en la electroforesis.

Se hizo un ensamblaje *de novo* mediante el paquete de programas Velvet (Zerbino, 2010) y Unicycler (Wick et al., 2017), determinándose un tamaño de 14204 bp (Fig. 10). Las características generales del plásmido se muestran en la Tabla 8.

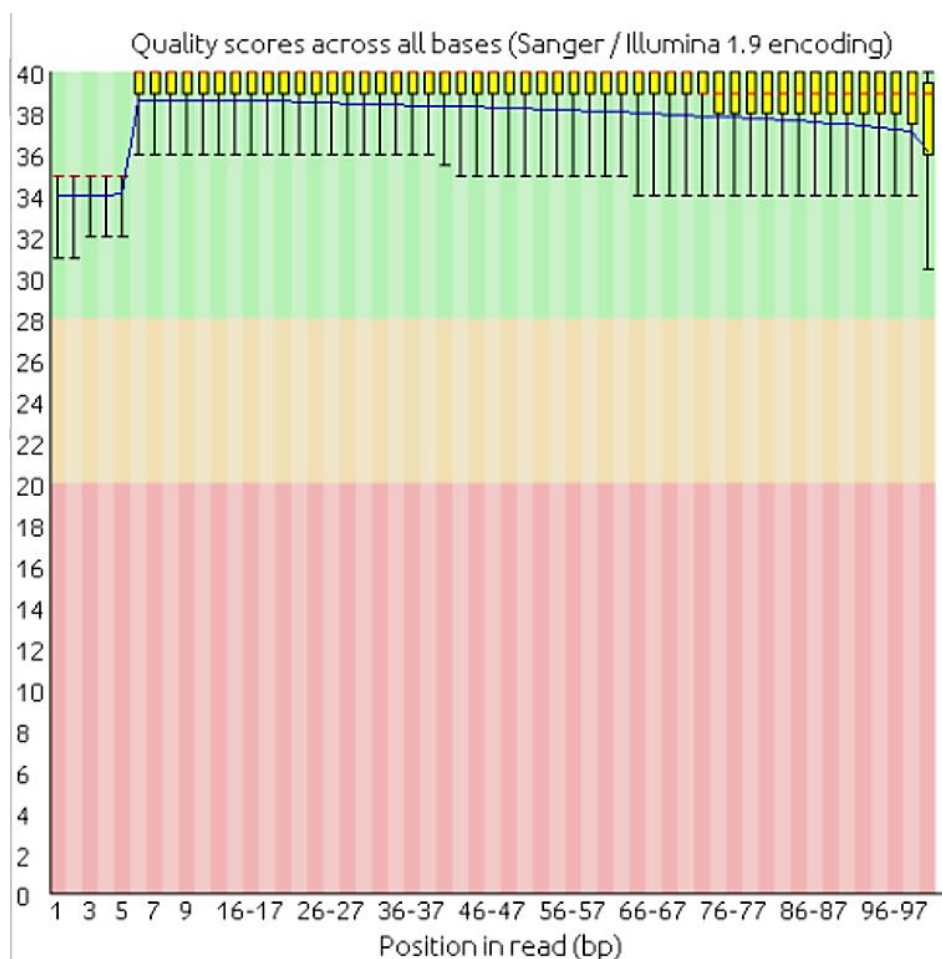


Figura 9. Calidad de las secuencias crudas recibidas del DNA plasmídico de *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506. Esta imagen presenta tres sectores, el de **color verde es de calidad buena**, el anaranjado aceptable y el rojo es de mala calidad. Las barras en amarillo corresponden al rango de 25 a 75% de las secuencias, su proyección en líneas corresponden del 10 al 90% de las secuencias. La línea es la calidad media de las secuencias.

Tabla 8. Características generales del plásmido pAfPQ506-1

pAfPQ506-1	
Tamaño	14204 pb
Contenido de GC	59.4%
Genes codificantes de proteínas	16
Proteínas con función asignada	8
Proteínas hipotéticas	8

Estas características se determinaron usando los *softwares*, ORFfinder, BlastP, GeneMarkS, Prokka y RAST (4.3.3.), y el %GC con WebDSVla 2.0 (<http://www.molbiotools.com/WebDSV/>).

### 5.2.1 Anotación del plásmido pAfPQ506-1 de *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506

El análisis genómico *in silico* del plásmido reveló la presencia de secuencias codificantes (CDS) de proteínas. Los genes de proteínas con función asignada encontrados se detallan en la Tabla 9, y su localización en el plásmido se muestra en la Figura 10.

Tabla 9. Secuencias codificantes encontradas en el plásmido pAfPQ506-1

	DESIGNACIÓN DEL ORF	PRODUCTO PROTÉICO	E value	Identidad (%)	Organismo cercano
OPERÓN <i>ars</i>	ArsA	ATPasa de la bomba de arsénico. Similar a gen ortólogo con producto del mismo nombre. Categoría funcional COG = P (transporte de iones inorgánicos y metabolismo).	0	93.87	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
	ArsD	Represor que actúa en trans del operon de resistencia al arsénico. Similar a gen ortólogo con producto del mismo nombre. Categoría funcional COG = S (función desconocida).	8.00E-71	95.83	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
	ArsC	Arsenato reductasa.	4.00E-103	91.30	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
	ArsR	Regulador transcripcional (superfamilia HTH).	1.00E-55	74.79	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
	ArsB	Proteína de la bomba de eflujo de arsénico.	2.00E-66	93.33	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> , <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
	MobA	Proteína de movilización. Similar a gen ortólogo con producto proteína con dominio de relajasa/movilización/ nucleasa (MobA). Categoría funcional COG = U (tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular).	0	89.94	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> , <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
	Hipotético	Proteína hipotética	5.00E-60	95.56	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>
	Hipotético	Proteína hipotética	6.00E-27	57.45	<i>Acidithiobacillus caldus</i>
	Hipotético	Proteína hipotética	1.00E-24	79.22	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
	Rep	Proteína de replicación. Similar a gen ortólogo con producto del mismo nombre. Categoría funcional COG = S (función desconocida).	4.00E-119	82.59	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.
	Hipotético	Proteína hipotética	2.00E-52	91.30	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
	Hipotético	Proteína hipotética. Similar a gen ortólogo con producto proteína con dominio DUF4160. Categoría funcional COG = S (función desconocida).	4.00E-55	96.51	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> , <i>Thiorhodovibrio</i> sp.
	Hipotético	Proteína hipotética. Similar a gen ortólogo con producto proteína con dominio DUF2442. Categoría funcional COG = S (función desconocida).	6.00E-52	95.24	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> , <i>Herbaspirillum seropedicae</i>
	Hipotético	Proteína hipotética	5.80E-24	53.80	<i>Shinella</i> sp. MEC087, p039 [ <i>Rhizobium</i> phage 16-3]
	Proteína óxidorreductasa disulfuro-piridin nucleótido dependiente de FAD	Proteína putativa óxidorreductasa disulfuro-piridin nucleótido dependiente de FAD. Similar a gen ortólogo con producto protéico del mismo nombre. Categoría funcional COG = P (transporte de iones inorgánicos y metabolismo).	0	91.30	Metagenoma de drenaje de minas, <i>Thiomonas arsenitoxydans</i>
	Hipotético	Proteína hipotética. Similar a gen ortólogo con producto proteína con dominio CBS (cistationina-beta-sintasa). Categoría funcional COG = S (función desconocida).	7.00E-41	59.65	<i>Thiomonas</i> sp., <i>Thiomonas arsenitoxydans</i>

Para la anotación se usaron los programas ORFfinder, Prokka, RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) y GenMark (<http://exon.gatech.edu/GeneMark/>), los análisis de similaridad se realizaron usando BlastP contra las bases de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) y UniProt (<https://www.uniprot.org/>). La categoría funcional COG se asignó usando eggNOG (*evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups Cluster*) (Huerta-Cepas et al., 2018) (<http://eggno-mapper.embl.de/>).

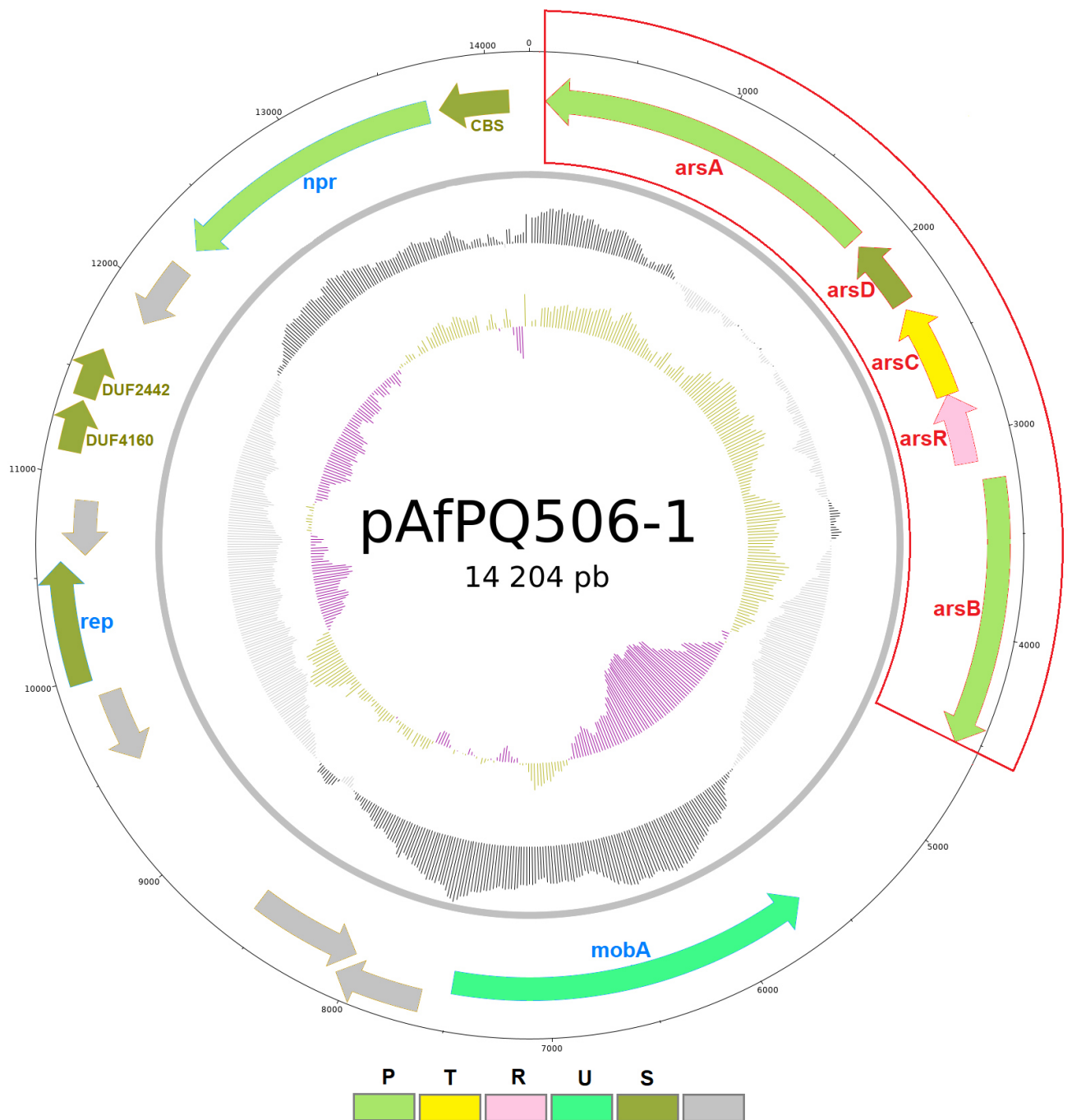
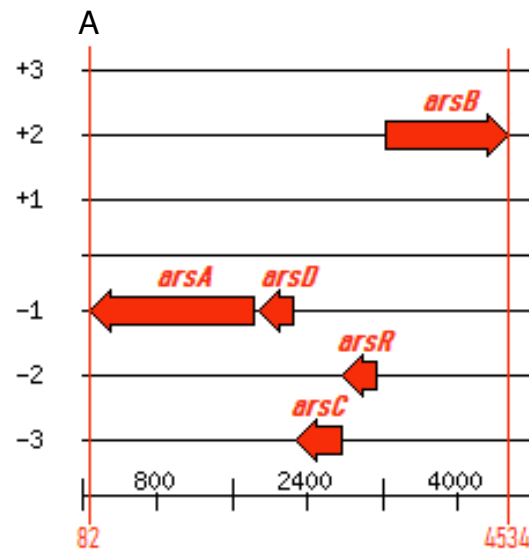


Fig. 10. Características del plásmido pAfPQ506-1 de 14204 pb de *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506. Del centro hacia afuera: El primer anillo es la asimetría de GC (GCskew), que se indica con sombreado color beige y violeta, donde el beige indica un GCskew positivo y el violeta uno negativo. El segundo anillo es el contenido de G+C que se indica con sombreado negro y gris, donde el negro representa un contenido más alto y el gris uno más bajo de G+C que el promedio del plásmido. El tercer anillo representa la secuencia de DNA plasmídico. Los anillos 4 y 5 muestran la predicción de genes codificantes de proteínas sobre la cadena *forward* y *reverse*, respectivamente. Los genes predichos se indican con flechas de un color correspondiente a una categoría funcional eggNOG (*evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous GroupsCluster*) (Huerta-Cepas et al., 2018) indicada en la leyenda. P=transporte y metabolismo de iones inorgánicos; T=mecanismos de transducción de señal; R=sólo predicción de función general, U=tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular; S=función desconocida. Los genes de proteínas hipotéticas sin categoría funcional están representados con flechas grises. El anillo 6 muestra el número de nucleótidos del plásmido marcados por cada 1000. Se ha marcado la región del operón *ars*, con secuencias relacionadas a la resistencia al arsénico.

### 5.2.2 Análisis comparativo del operón *arsADCRB*

El plásmido pAfPQ506-1 de la cepa *Acidithiobacillus ferrooxidans* 506 presentó los genes *arsA*, *arsD*, *arsC*, *arsR* y *arsB* conformando el operón *arsADCRB*, que se extiende desde el nucleótido 82 hasta el 4534 (Fig. 11) y que conferiría resistencia al arsénico. El operón fue comparado con 63 plásmidos y 41 genomas cromosomales de la base de datos del servidor RAST, de bacterias procedentes de ambientes mineros, suelos, lagunas, océanos y algunas de origen clínico que presentaban resistencia al arsénico (Tablas 10 y 11). De los 63 plásmidos, solamente 18 presentaron genes de resistencia al arsénico (Fig. 12). Los plásmidos pTcM1 y pLAtc3 de las cepas *Acidithiobacillus caldus* MNG y *Acidithiobacillus caldus* SM-1, respectivamente, presentaron los genes *arsA*, *arsD*, *arsC*, *arsR* con una mayor identidad (0.86, 0.65, 0.71, 0.53) a los genes del mismo nombre en el plásmido pAfPQ506-1, en comparación con los demás plásmidos (Tabla 10). Los genes de resistencia al arsénico localizados en el cromosoma de las especies *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus caldus* presentaron identidad elevada a los genes *arsADCRB* del plásmido pAfPQ506-1, en comparación con los demás cromosomas bacterianos analizados (Tabla 11). Con respecto a *Acidithiobacillus caldus*, la mayoría de cepas mostró un patrón marcado de 3 genes (*arsC*, *arsR*, *arsB*), a excepción de los dos plásmidos arriba mencionados.






B

Inicio (nucleótido)	Final (nucleótido)	Longitud (pb)	Función asignada
82	1845	1764	ATPasa bomba de arsénico (ArsA)
1888	2250	363	Represor que actúa en trans (ArsD)
2289	2774	486	Arsenato reductasa (ArsC)
2771	3136	366	Regulador transcripcional (ArsR)
3727	4534	1308	Proteína de bomba de eflujo de arsénico (ArsB)

Figura 11. Localización de los genes *arsA*, *arsD*, *arsC*, *arsR* y *arsB* que conforman el operón *arsADCRB* en el plásmido pAfPQ506-1. A) Representación gráfica indicando el nucleótido de inicio y término del operón. B) Indicación de los nucleótidos de inicio, término y longitud en pares de bases de cada gen del operón *arsADCRB*.



Tabla 10. Identidad de los genes *arsA*, *arsD*, *arsC*, *arsR* y *arsB* del plásmido pAfPQ506-1 a los genes homólogos de plásmidos de diferentes bacterias según el servidor RAST.


CEPAS Y PLÁSMIDOS BACTERIANOS		GENES DE RESISTENCIA AL ARSÉNICO*					GENES <i>ars</i> ANOTADOS	ORIGEN DEL AISLADO
								
D N A  P L A S M I D I A L	pAfPQ506-1 ( <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> PQ506)	<i>arsA</i>	<i>arsD</i>	<i>arsC</i>	<i>arsR</i>	<i>arsB</i>	<i>arsA</i> , <i>arsD</i> , <i>arsC</i> , <i>arsR</i> , <i>arsB</i>	Ambiental (relave minero)
	pLAtc3 ( <i>Acidithiobacillus caldus</i> SM-1)	86	65	71	53		<i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental (reactor minero)
	pTcM1 ( <i>Acidithiobacillus caldus</i> MNG)	86	65	71	52		<i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental (agua termal)
	pUNNAMED3 ( <i>Cupriavidus metallidurans</i> Ni-2)	70	55	65		64	<i>arsB</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental (suelo)
	pRALTA ( <i>Cupriavidus taiwanensis</i> LMG19424)			43	51	ND	<i>arsB</i> (ACR3), 3 <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsH</i>	Ambiental (suelo-vegetales)
	pAZKH ( <i>Azoarcus</i> sp. KH32C)	72	61	66	48	ND	<i>arsB</i> (ACR3), <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental (suelo agrícola)
	pCNB ( <i>Comamonas testosteroni</i> CNB-1)			43	48	65	<i>arsB</i> , <i>arsR</i> , 2 <i>arsC</i>	Ambiental (lodo activado)
	pACMV2 ( <i>Acidiphilium multivorum</i> AIU 301)			44	44	70	<i>arsB</i> , 2 <i>arsC</i> , <i>arsR</i> , <i>arsH</i>	Ambiental (relave minero)
	pEC-IMPQ_177 ( <i>Enterobacter cloacae</i> )			ND	ND	60	<i>arsB</i> , <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsH</i>	Patógeno humano
	pK29 ( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )			ND	ND	60	<i>arsB</i> , <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsH</i>	Patógeno humano
	pR485 ( <i>Morganella morganii</i> M203)			42	50	ND	<i>arsB</i> (ACR3), <i>arsR</i> , <i>arsC</i>	Patógeno humano
	pFRL4 ( <i>Streptomyces</i> sp. F2)			33	32	ND	<i>arsB</i> (ACR3), 3 <i>arsR</i> , 2 <i>arsC</i>	Ambiental (suelo)
	pFRL6 ( <i>Streptomyces</i> sp. F12)			33	32	ND	<i>arsB</i> (ACR3), 3 <i>arsR</i> , 2 <i>arsC</i>	Ambiental (suelo)
	pFRL5 ( <i>Streptomyces</i> sp. F8)	51	52	32	34	ND	4 <i>arsB</i> (ACR3), 12 <i>arsR</i> , 8 <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , 2 <i>arsA</i>	Ambiental (suelo)
	pFRL3 ( <i>Streptomyces</i> sp. FR1)			33	32	ND	<i>arsB</i> (ACR3), 3 <i>arsR</i> , 2 <i>arsC</i>	Ambiental (suelo)
	pR64 ( <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium)	70	54	ND	32	62	<i>arsB</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , 2 <i>arsA</i> , <i>arsH</i>	Patógeno humano
	pR773 ( <i>Escherichia coli</i> )	77	47	50	41	62	2 <i>arsB</i> (ACR3), 3 <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i> , <i>arsH</i>	Patógeno humano
	pl258 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )			32	ND	52	<i>arsB</i> , <i>arsR</i> , <i>arsC</i>	Patógeno humano
	pYVe227 ( <i>Yersinia enterocolitica</i> W22703)			ND	ND	61	<i>arsB</i> , <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsH</i>	Patógeno humano

ND: No determinado (no hay identidad con los genes del plásmido pAfPQ506-1).

\*Las cifras en esta columna son porcentajes de identidad.

Se muestran los plásmidos que presentaron *arsA*, *arsD*, *arsC*, *arsR* y *arsB* con mayor identidad.

Tabla 11. Identidad de los genes *arsA*, *arsD*, *arsC*, *arsR* y *arsB* del plásmido pAfPQ506-1 a los genes homólogos del cromosoma de diferentes bacterias según el servidor RAST.

CEPAS BACTERIANAS		GENES DE RESISTENCIA AL ARSÉNICO*					GENES <i>ars</i> ANOTADOS	ORIGEN DEL AISLADO
								
	pAfPQ506-1 ( <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> PQ506)	<i>arsA</i>	<i>arsD</i>	<i>arsC</i>	<i>arsR</i>	<i>arsB</i>	<i>arsA</i> , <i>arsD</i> , <i>arsC</i> , <i>arsR</i> , <i>arsB</i>	Ambiental (relave minero)
	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> PRJEB5721 AFERRI	93	95	91	63	94	<i>arsB</i> , <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental
	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> PQ33	93	95	91	62	94	<i>2arsB</i> , <i>2arsR</i> , <i>2arsC</i> , <i>2arsD</i> , <i>2arsA</i>	Ambiental
	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> YL15	93	95	91	82	94	<i>2arsB</i> , <i>2arsR</i> , <i>2arsC</i> , <i>2arsD</i> , <i>2arsA</i>	Ambiental
	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> SS3	93	95	91	62	94	<i>arsB</i> , <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental
	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> CF27	93	95	91	63	94	<i>arsB</i> , <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental
D	<i>Acidithiobacillus caldus</i> ATCC 51756			78	74	83	<i>arsB</i> , <i>arsR</i> , <i>2arsC</i>	Ambiental
N	<i>Acidithiobacillus caldus</i> MTH-04			77	74	90	<i>arsB</i> , <i>arsR</i> , <i>2arsC</i>	Ambiental
A	<i>Acidithiobacillus caldus</i> SM-1			78	74	83	<i>arsB</i> , <i>arsR</i> , <i>2arsC</i>	Ambiental
	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270			75	74	82	<i>arsB</i> , <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsH</i>	Ambiental
	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 53933			75	74	87	<i>arsB</i> , <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsH</i>	Ambiental
C	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Hel18			75	74	87	<i>arsB</i> , <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsH</i>	Ambiental
R	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> BY0502	91	92	85	87	94	<i>arsB</i> , <i>2arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental
O	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> V8			45	42	79	<i>arsB</i> , <i>2arsR</i> , <i>2arsC</i>	Ambiental
M	<i>Acidihalobacter properus</i> F5			41	41	76	<i>arsB</i> , <i>arsR</i> , <i>arsC</i>	Ambiental
O	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> ATCC 7966	67	53	ND	46	ND	<i>arsB</i> (ACR3), <i>2arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Clínico
S	<i>Alkalilimnicola ehrlichii</i> MLHE-1	52	50	37		ND	<i>arsB</i> (ACR3), <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental
O	<i>Aurantimonas</i> sp. SI85-9A1			46	47	70	<i>arsB</i> , <i>arsR</i> , <i>2arsC</i> , <i>arsH</i>	Ambiental
M	<i>Azoarcus</i> sp. EbN1	70	57	69	51	ND	<i>arsB</i> (ACR3), <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental
A	<i>Azoarcus</i> sp. BH72	53	43	47	49	ND	<i>arsB</i> (ACR3), <i>arsR</i> , <i>2arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental
L	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482	47	46	33	ND	ND	<i>2arsB</i> , <i>2arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>2arsD</i> , <i>2arsA</i>	Clínico
	<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	46	46	35	ND	ND	<i>arsB</i> (ACR3), <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Clínico
	<i>Cupriavidus metalidurans</i> CH34			43	45	ND	<i>arsB</i> (ACR3), <i>arsR</i> , <i>2arsC</i> , <i>arsH</i>	Ambiental
	<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB	69	62	48	48	ND	<i>2arsB</i> (ACR3), <i>2arsR</i> , <i>4arsC</i> , <i>2arsD</i> , <i>2arsA</i>	Ambiental
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> str. "Miyazaki F"	47	45		49		<i>arsR</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental
	<i>Geobacter uraniireducens</i> Rf4	50	39		38	ND	<i>arsB</i> , <i>arsR</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental

Continuación: Tabla 11. Identidad de los genes *arsA*, *arsD*, *arsC*, *arsR* y *arsB* del plásmido pAfPQ506-1 a los genes homólogos del cromosoma de diferentes bacterias según el servidor RAST.

CEPAS BACTERIANAS	GENES DE RESISTENCIA AL ARSÉNICO*	GENES <i>ars</i> ANOTADOS	ORIGEN DEL AISLADO
-------------------	-----------------------------------	---------------------------	--------------------



		<i>arsA</i>	<i>arsD</i>	<i>arsC</i>	<i>arsR</i>	<i>arsB</i>		
D	pAfPQ506-1 ( <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> PQ506)						<i>arsA</i> , <i>arsD</i> , <i>arsC</i> , <i>arsR</i> , <i>arsB</i>	Ambiental (relave minero)
N	<i>Hermiimonas arsenicoxydans</i>			50	51	62	<i>2arsB</i> , <i>arsB</i> (ACR3), <i>3arsR</i> , <i>4arsC</i> , <i>3arsH</i>	Ambiental
A	<i>Klebsiella michiganensis</i> 3T412C	70	53	ND	ND	61	<i>arsB</i> , <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>2arsA</i>	Ambiental
	<i>Klebsiella michiganensis</i> HKOPL1	69	53	ND	38	62	<i>arsB</i> , <i>2arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>2arsD</i> , <i>2arsA</i> , <i>arsH</i>	Ambiental
	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	49	40	34	37		<i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental
C	<i>Methylomonas methanica</i> MC09	69	58	61	57		<i>arsB</i> (ACR3), <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental
R	<i>Methylobacillus flagellatus</i> KT	71	57	70		63	<i>arsB</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental
O	<i>Photobacterium profundum</i> 3TCK	64	58	30	33	ND	<i>arsB</i> (ACR3), <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental
M	<i>Planctomyces limnophilus</i> DSM 3776	47	46	37			<i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental
O	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1			51	28	61	<i>arsB</i> , <i>2arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsH</i>	Clínico
S	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	53		46	41		<i>arsR</i> , <i>2arsC</i> , <i>arsA</i>	Ambiental
O	<i>Rhodoferrax ferrireducens</i> T118	69	53	67	50	26	<i>arsB</i> , <i>arsB</i> (ACR3), <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental
M	<i>Rhodoferrax ferrireducens</i> DSM 15236	69	53	67	50	26	<i>arsB</i> , <i>arsB</i> (ACR3), <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental
A	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a			49	49	27	<i>arsB</i> , <i>arsB</i> (ACR3), <i>arsR</i> , <i>2arsC</i> , <i>arsH</i>	Clínico
L	<i>Sulfuriferula</i> sp. AH1	86	61	71	47	61	<i>arsB</i> , <i>arsR</i> , <i>arsC</i> , <i>arsD</i> , <i>arsA</i>	Ambiental
	<i>Thioalkalivibrio</i> sp. HL-EbGR7			45	44	61	<i>arsB</i> , <i>arsB</i> (ACR3), <i>arsR</i> , <i>arsC</i>	Ambiental

ND: No determinado (no hay identidad con los genes del plásmido pAfPQ506-1).

\*Las cifras en esta columna son porcentajes de identidad.

Se muestran los cromosomas que presentaron *arsA*, *arsD*, *arsC*, *arsR* y *arsB* con mayor identidad.

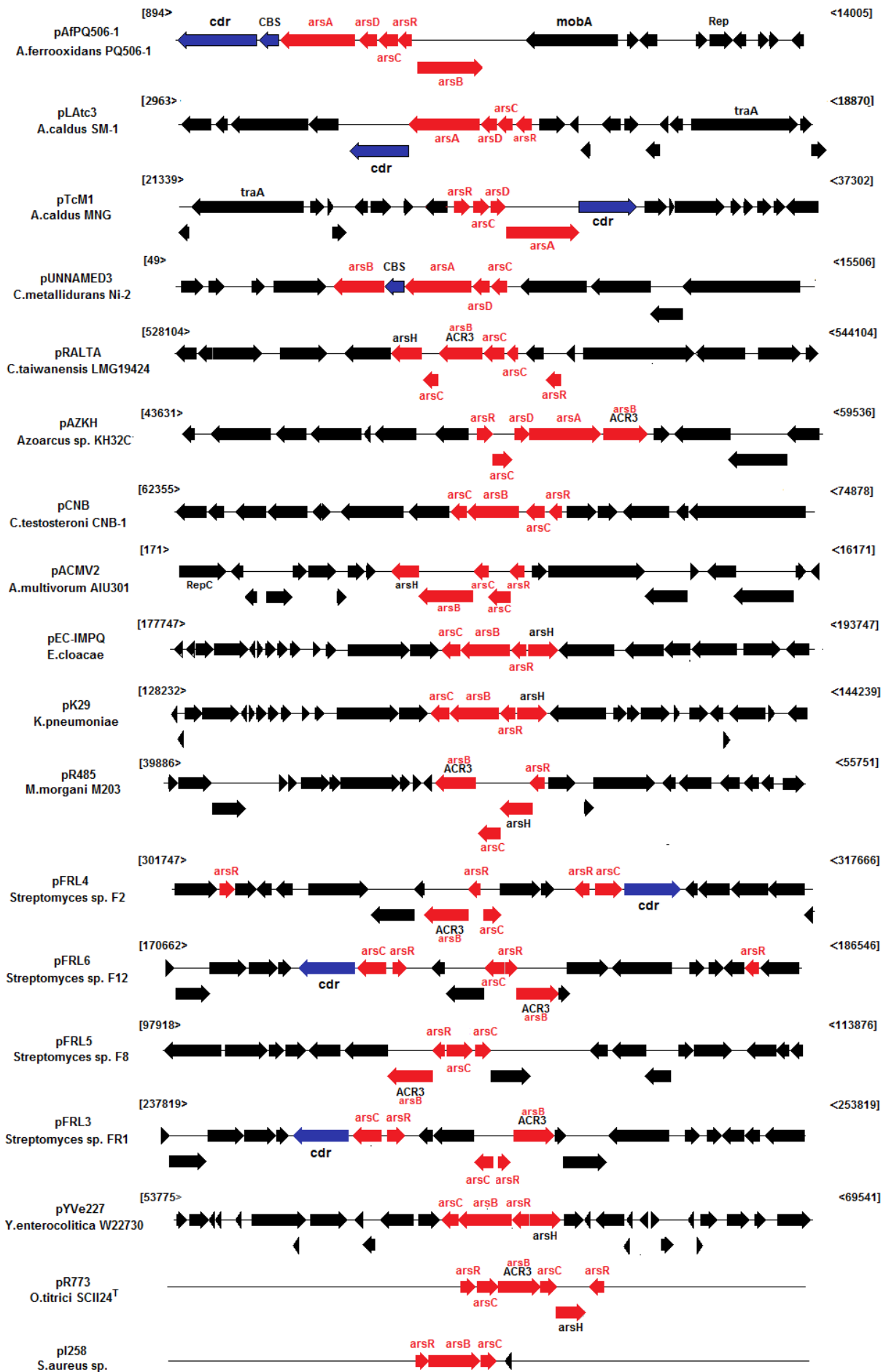


Figura 12. Plásmidos bacterianos con genes homólogos a *arsADCRB* del plásmido pAfPQ506-1 obtenidos usando el servidor RAST.

### 5.2.3 Análisis filogenético de los plásmidos y del gen *arsC*

Las secuencias completas de los 63 plásmidos mencionados en 5.2.6 (de origen tanto ambiental como clínico) fueron alineadas para generar un árbol de distancias genéticas, identificando los plásmidos que presentan genes de resistencia al arsénico (Figura 13). Se observa que el plásmido pAfPQ506-1 de *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506, que porta el operón *arsADCRB*, es más cercano al plásmido pAfPQ33-1, que no lo porta, pero que pertenece a la cepa *A. ferrivorans* PQ33 que fue aislada de su mismo hábitat. Ambos plásmidos también son cercanos a pAfPQ510-1 y pAfPQ510-2 de *A. ferrivorans* PQ510 del mismo hábitat y a pACA1.2 (acceso *European Nucleotide Archive* ENA N° CP005989) de *A. caldus* ATCC 51756 (Valdes et al., 2009). Los plásmidos pAfPQ510-1 y pAfPQ510-2 de *A. ferrivorans* PQ510 son cercanos entre sí y distantes a pAfPQ510-3.

Los genes y proteínas de *arsC* (arsenato reductasa) fueron escogidos para realizar un análisis filogenético por ser el más ampliamente distribuido entre los plásmidos y cromosomas analizados. Las secuencias de *arsC* fueron obtenidas por BlastN y BlastP extraídas de 18 plásmidos. Los árboles obtenidos a partir de secuencias nucleotídicas (Figura 14) y proteicas (Figura 15) del gen *arsC*, son congruentes en cuanto al orden de los clados y las distancias determinadas. En ambas figuras se muestra que *arsC* del plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans* PQ506 presenta mayor identidad a *arsC* de los plásmidos pAZKH de *Azoarcus* sp. (Nishizawa et al., 2012), p3 de *C. metallidurans* ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1061?genome\\_assembly\\_id=364554](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1061?genome_assembly_id=364554) con acceso GenBank N° CP026547.1) y pLAtc3 (acceso GenBank N° CP002577.1) (You et al., 2011) y pTcM1 (acceso GenBank N° EU421841) (van Zyl et al., 2008) ambos de *A. caldus*. Todas son bacterias que habitan en ambientes extremos con metales pesados. Asimismo, se observa menor identidad a *arsC* de plásmidos de otras especies como pACMV02 de *Acidiphilium multivorum* (Acceso GenBank N° AP012037.1), plásmidos de *Streptomyces* spp. (Acceso GenBank N° KF602048.1, KF602049.1, KF602050.1 y KF602051.1), *S. aureus* (Ji y Silver, 1992) (Acceso GenBank

Nº GQ900378.1), *E. coli* (Chen et al., 1986; San Francisco et al., 1990; Wu y Rosen, 1991; Wu y Rosen, 1993) (Acceso GenBank Nº J02591.1, AAA21094.1, AAA21095.1, AAA21096.1) y otras enterobacteriáceas (Acceso GenBank Nº EF382672.1, EU855788.1, HE577112.1, AP005147.1 y AF102990.1).



48



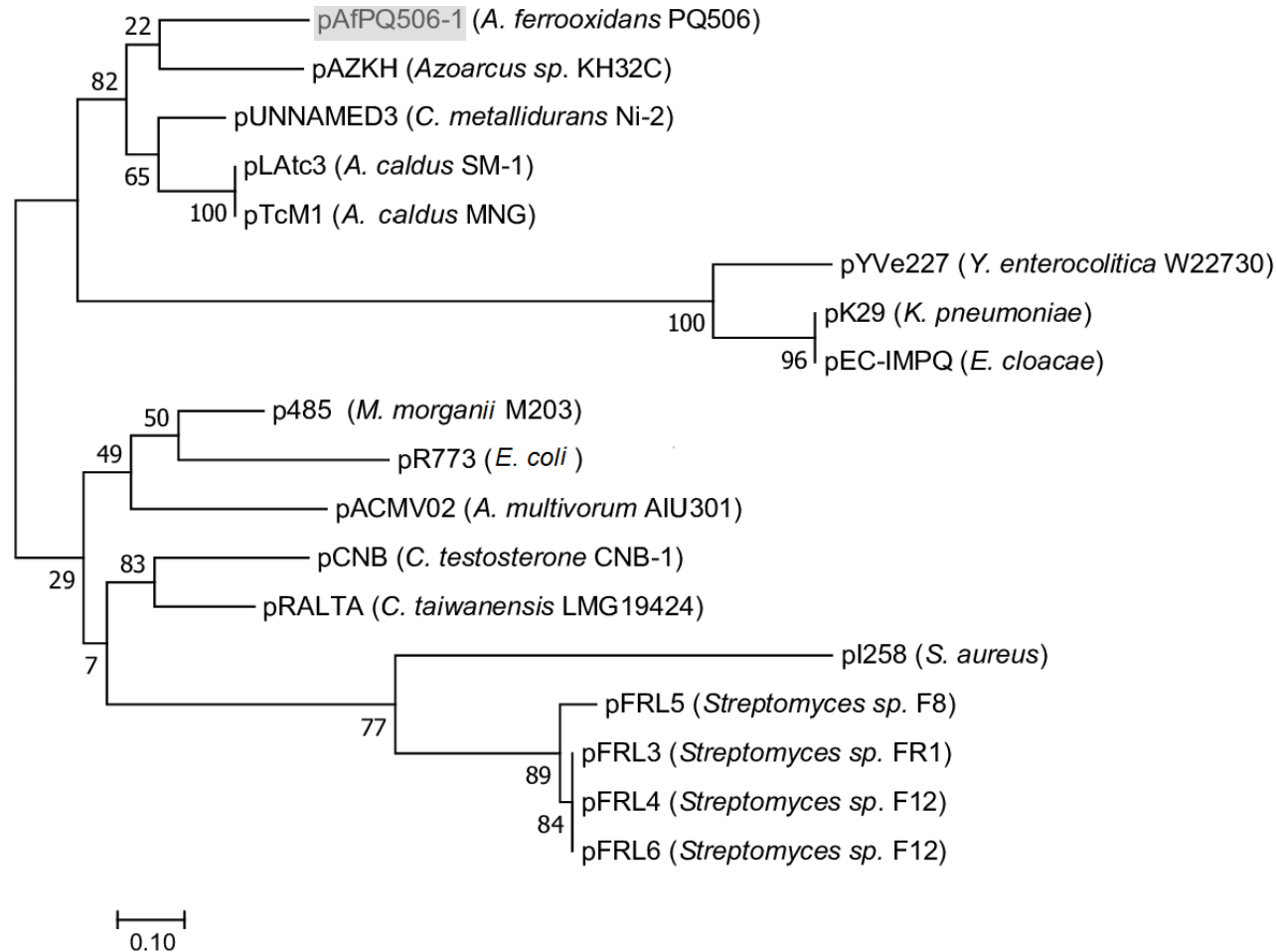


Figura 14. Árbol filogenético de Máxima verosimilitud basado en la secuencia nucleotídica de *arsC* de los plásmidos portadores de genes de resistencia a arsénico de bacterias procedentes de ambientes mineros, suelos, lagunas, océanos y algunas de origen clínico. Las secuencias de los genes *arsC* (más conservadas y distribuidas entre estos plásmidos) fueron alineadas con MAUVE y el árbol fue generado con MEGA 7. Los números en las raíces son porcentaje de 1000 *bootstraps*. El número de la barra es distancia genética. Se ha sombreado el plásmido de este estudio.



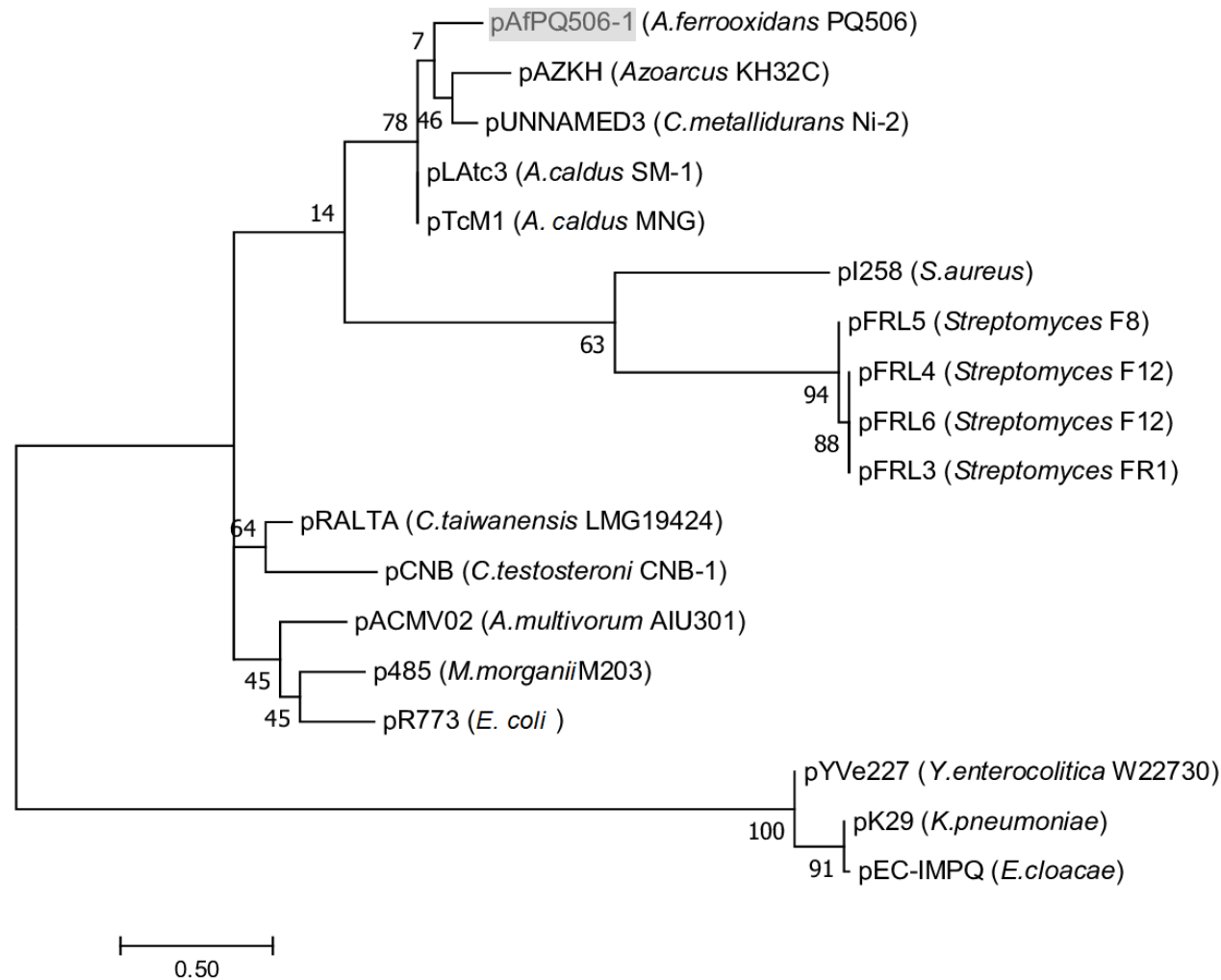


Figura 15. Árbol filogenético de Máxima verosimilitud basado en la secuencia aminoacídica de ArsC de los plásmidos portadores de genes de resistencia a arsénico de bacterias procedentes de ambientes mineros, suelos, lagunas, océanos y algunas de origen clínico. Las secuencias aminoacídicas de ArsC fueron alineadas con MAUVE y el árbol fue generado con MEGA 7. Los números en las raíces son porcentaje de 1000 *bootstraps*. El número de la barra es distancia genética. Se ha sombreado el plásmido de este estudio.

#### 5.2.4 Análisis comparativo entre los plásmidos más relacionados

Los genes de resistencia a arsénico del plásmido pAfPQ506-1 presentan una mayor identidad a los genes homólogos de los plásmidos pTcM1 y pLAtc3 de las cepas *Acidithiobacillus caldus* MNG y *Acidithiobacillus caldus* SM-1, respectivamente (Figuras 16 y 17). La Fig. 16 muestra una alta identidad de los genes *arsA*, *arsD*, *arsC* y *cdr* (CoA disulfuro reductasa o NADH oxidasa o disulfuro óxidoreductasa dependiente de FAD) entre los plásmidos pAfPQ506-1 y pTcM1, y que éste no presenta *arsB* (gen de la bomba de arsénico); asimismo, está invertido el orden de los genes *ars* y *cdr* de pAfPQ506-1 con respecto a pTcM1. En la Fig. 17 se observa que también hay una alta identidad de los genes antes mencionados, así como de una parte del gen *mobA* entre los plásmidos pAfPQ506-1 y pLAtc3, y que éste tampoco presenta *arsB*; asimismo, la orientación de *arsA*, *arsD*, *arsC* y *cdr* es la misma en ambos plásmidos. En la Fig. 18 se aprecia que el plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans* tiene una región con alta identidad al plásmido pAfPQ33-1 de *A. ferrivorans*. En esta región se encuentra el gen *mobA* (proteína de movilización) y dos hipotéticos, con la misma sintenia.

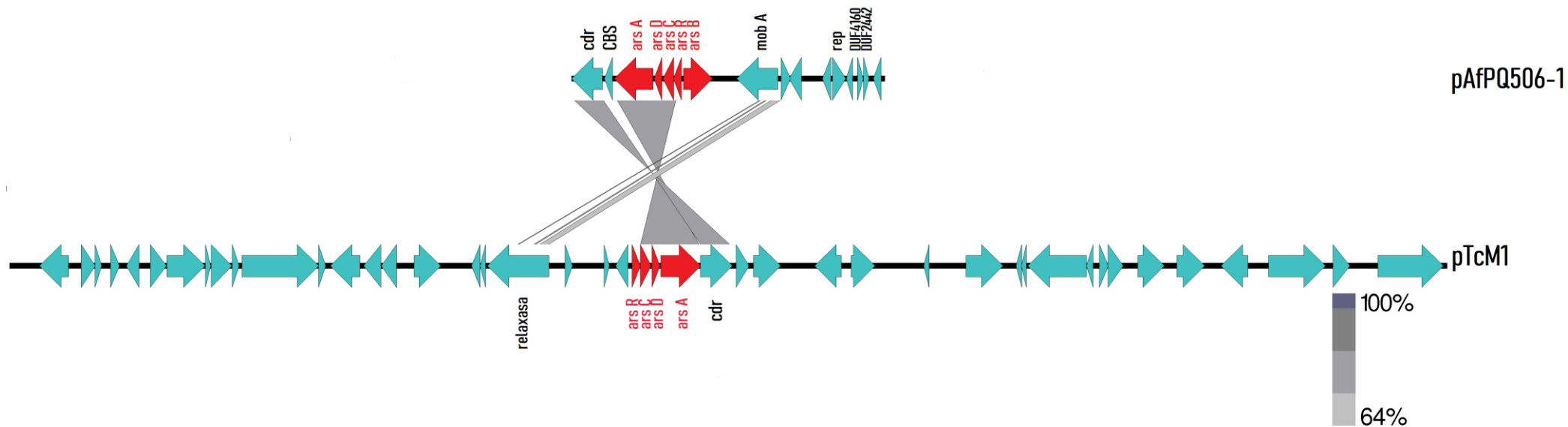


Figura 16. Análisis comparativo entre el plásmido pAfPQ506-1 de *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506 y el plásmido pTcM1 de *Acidithiobacillus caldus* MNG. La escala de grises indica porcentaje de identidad. Los genes del operón *arsADCRB* están en color rojo.

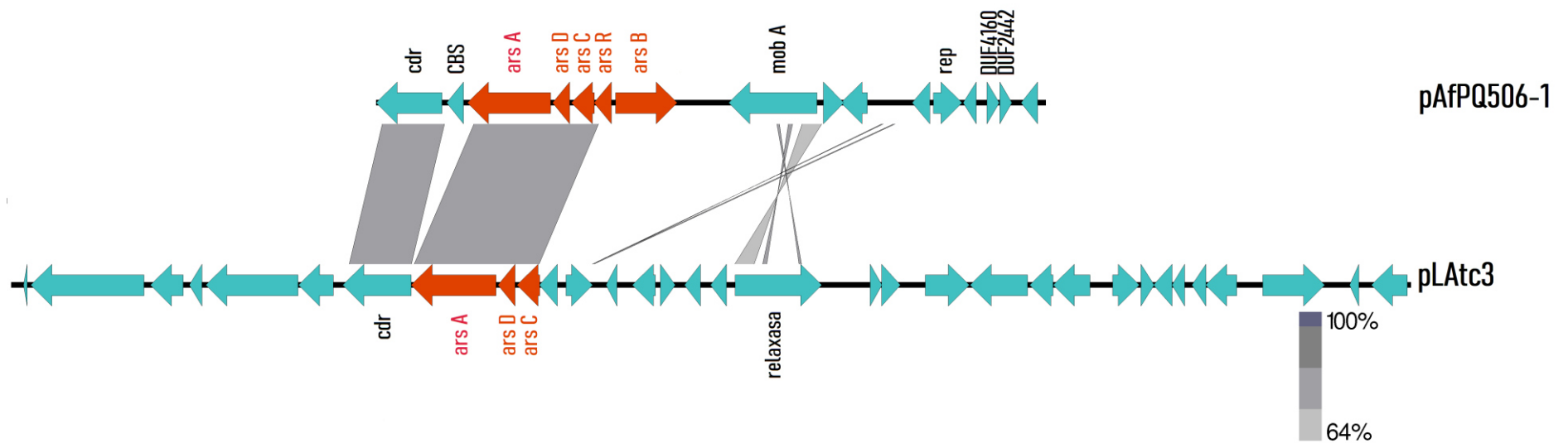


Figura 17. Análisis comparativo entre el plásmido pAfPQ506-1 de *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506 y el plásmido pLAtc3 de *Acidithiobacillus caldus* SM-1. La escala de grises indica porcentaje de identidad. Los genes del operón *arsADCRB* están en color rojo.

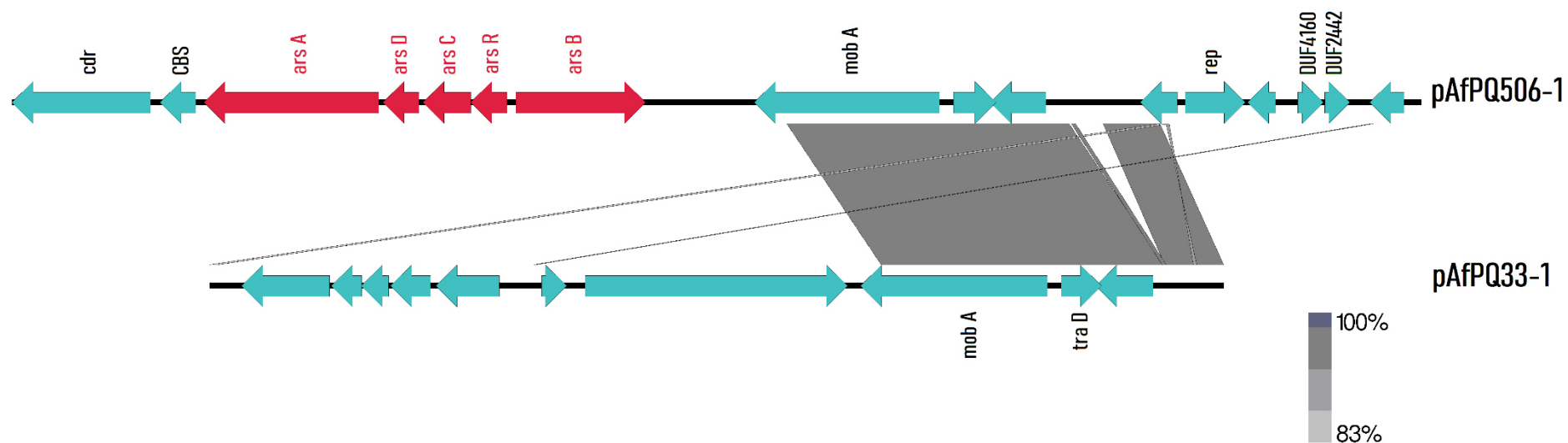


Figura 18. Análisis comparativo entre el plásmido pAfPQ506-1 de *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506 y el plásmido pAfPQ33-1 de *Acidithiobacillus ferrivorans*. La escala de grises indica porcentaje de identidad. Los genes del operón *arsADCRB* están en color rojo.

## 6. DISCUSIÓN

En este estudio se ha caracterizado molecular y genómicamente los plásmidos extraídos de las cepas nativas *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ510 y *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506, aisladas de una zona minera de Cerro de Pasco, Perú. En dichas cepas se encontraron tres y un plásmido, respectivamente, de tamaños y secuencias codificantes variadas. Esta característica ya había sido observada por Ni *et al.* (2008), afirmando que los aislados del género *Acidithiobacillus* exhiben un alto grado de variabilidad genética entre las cepas de la misma especie incluyendo el número y tamaño de plásmidos.

### 6.1 Caracterización molecular y genómica de los plásmidos de *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ510

Se encontraron tres plásmidos, pAfPQ510-1, pAfPQ510-2 y pAfPQ510-3, de un tamaño de 28369, 16745 y 12365 pb, respectivamente.

Existen solamente dos publicaciones sobre el hallazgo de plásmidos en esta especie: Tran *et al.* (2017) reporta un plásmido de 46453 pb (AFERRlp, con número de acceso LT841306 del Archivo Europeo de Nucleótidos (ENA, <https://www.ebi.ac.uk/ena>)) en la cepa CF27, y en el Perú, Eca (2016) encontró dos plásmidos de 10218 (pAfPQ33-1) y 12094 pb (pAfPQ33-2), respectivamente, en la cepa PQ33 aislada de aguas ácidas de minas de Cerro de Pasco.

El plásmido AFERRlp de *A. ferrivorans* CF27 porta 50 secuencias codificantes (CDS), incluyendo genes que se predice están involucrados en la replicación (*repA*) y movilización del plásmido (*mob*), en sistemas toxina–antitoxina, en la resistencia al cobre (operón *cus*) y a sistemas de eflujo multidroga (operón *acr*) (Tran *et al.*, 2017). La sintenia de los genes de los operones *cus* y *acr* es similar a la observada en los plásmidos identificados en *A. caldus* SM-1, sugiriendo un origen similar (Tran *et al.*, 2017).

El plásmido pAfPQ33-1 tiene 10 CDS, prediciéndose genes involucrados en la replicación (*repA*, *xerD*), transferencia (*traD*) y movilización del plásmido

(*mobA*), en regulación transcripcional, en actividades enzimáticas como Diguanylat ciclasa-fosfodiesterasa con dominio quimiorreceptor de unión a zinc, y varias secuencias codificantes de proteínas hipotéticas (Eca, 2016). El plásmido pAfPQ33-2 tiene 12 CDS, incluyendo genes predichos de replicación (*dnaJ*), transferencia (*traD*) y movilización del plásmido (*mobA*), de sistema toxina-antitoxina (*hicA*, *hicB*), porina O/P, endonucleasa VapD y varias secuencias codificantes de proteínas hipotéticas (Eca, 2016).

En este estudio, el análisis de la secuencia completa de los plásmidos pAfPQ510-1, pAfPQ510-2 y pAfPQ510-3 de la cepa *At. ferrivorans* PQ510 ha generado conocimientos acerca de los genes putativos que portan y la función que cumplen (predicha o asignada por herramientas bioinformáticas).

Así, se ha encontrado en dichos plásmidos 41, 21 y 15 CDS, respectivamente, de proteínas resolvasa, de metabolismo de coenzimas, metabolismo de carbohidratos, de producción y conversión de energía, oxidorreductasas, de replicación, recombinación y reparación de DNA, de movilización, transporte y metabolismo de aminoácidos, de segregación del plásmido, de sistemas toxina-antitoxina, de sistemas modificación-restricción, reguladores transcripcionales, con dominio F-box, y proteínas hipotéticas (Tablas 5, 6 y 7). Las funciones asignadas se discuten a continuación:

### ● **Proteína Tin R Resolvasa/Integrasa**

Es una proteína de unión a DNA con actividad de recombinasa o DNA invertasa. La familia de proteínas resolvasa/invertasa o serina recombinasas son enzimas que comparten las siguientes características estructurales: un dominio N-terminal catalítico y de dimerización que contiene un residuo de serina conservado en la unión covalente transitoria al DNA, y un dominio de unión a DNA hélice-vuelta-hélice C-terminal (Garnier, et al., 1987) (<https://prosite.expasy.org/doc/PS51736>). Se han encontrado resolvasas/integrasas en cromosoma y plásmidos de bacterias, fagos, transposones (<https://prosite.expasy.org/doc/PS51736>).

Se ha encontrado una región codificante de proteína Tin R (558 pb) en el plásmido conjugativo pUM505 de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, con 100% de homología a TinR de *Burkholderia vietnamiensis* G4 (Nº

acceso ABO60124) codificada en el plásmido pBVIE02 (Ramírez-Díaz, 2011). También se ha hallado *tinR* en *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Aeromonas salmonicida*, entre otras bacterias (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=Resolvase%2FIntegrase+TinR+protein&sort=score>). No hay reportes en *Acidithiobacillus*.

El plásmido pAfPQ510-1 tiene una región codificante de TinR con un E-value 7.00E-64 y una identidad de 79.67% a la proteína TinR de *Pseudomonas aeruginosa* y de *Burkholderia vietnamiensis* G4 (Tabla 5). Tin R podría cumplir un papel importante en los eventos de recombinación del plásmido.

#### © 15-cis-fitoeno desaturasa

Es una enzima oxidorreductasa (<https://www.uniprot.org/uniprot/P21685>) integrada a la membrana que cataliza la desaturación de fitoeno (un tipo de caroteno) no coloreado a otros carotenos no saturados coloreados, como por ejemplo, el licopeno. El producto de la reacción enzimática depende del número de pasos de desaturación. Se ha aislado genes que codifican fitoeno desaturasa de bacterias (no fotosintéticas y fotosintéticas), hongos, cianobacterias y plantas superiores (Fraser et al., 1992). En la cianobacteria *Synechococcus* el gen *pds* codifica una fitoeno desaturasa que genera el producto ζ-caroteno al igual que el gen *pds* del tomate, ambas enzimas presentan una alta homología de secuencia aminoacídica y ambas requieren NAD (P) como cofactor (Sandmann, 1994). La cianobacteria *Anabaena* posee el gen *zds* de una fitoeno desaturasa que produce licopeno a partir de ζ-caroteno, en tanto que las bacterias *Rhodobacter* y *Erwinia* tienen el gen *crtI* de fitoeno desaturasa que produce licopeno a partir del fitoeno; ambas enzimas bacterianas requieren FAD como cofactor y presentan alta homología de secuencia aminoacídica (Sandmann, 1994). Como se puede apreciar, la fitoeno desaturasa de bacterias, está involucrada en la síntesis de carotenos. Estos productos son un importante grupo de pigmentos con distintas propiedades, entre ellas, la de ser antioxidantes (Chandi y Gill, 2011; Coker, 2016). Desde esta perspectiva, es posible que la enzima fitoeno desaturasa predicha en el



plásmido participe en la síntesis de algún tipo de caroteno que proteja a *Acidithiobacillus* del estrés oxidativo propio de su hábitat.

Todos los resultados demuestran que a lo largo del curso de la evolución se adquirieron dos fitoeno desaturasas completamente diferentes, no relacionadas, que no tienen un ancestro común: el grupo de las fitoeno desaturasas de las de plantas superiores, algas verdes y cianobacterias, y un segundo grupo de fitoeno desaturasas de bacterias y hongos (Sandmann, 1994).

Esta enzima está codificada en el plásmido pAfPQ510-1 de *A. ferrivorans* PQ510, y es 98.6% idéntica, con Evalve 0, a una amino oxidasa del genoma de *A. ferrivorans* SS3 (Nº Acceso WP\_014030331.1) codificada por el gen denominado *Acife\_3019* (<https://www.uniprot.org/uniprot/G0JUC3>). La enzima tiene >67% de identidad a amino oxidasas de bacterias como *Pseudomonas* sp., *Rhodoferrax ferrireducens*, *Thiothrix lacustris*, y 67.4% de indentidad a 15-cis-fitoeno desaturasa de *Pantoea* sp. AS-PWVM4 (Nº Acceso U2NIW5).

#### ● dTDP-4-dehidrorhamnosa reductasa

Es una enzima oxidorreductasa de la vía biosintética de la timidina difosfato-L-rhamnosa (TDP-L-rhamnosa), también denominada rhamnosa activada, un componente importante del lipopolisacárido (LPS) de las bacterias (<https://www.uniprot.org/uniprot/P55463>). La enzima está codificada por el gen *rmID*, usa NADH y NADPH, su cofactor es el  $Mg^{2+}$ , y es necesaria para el ensamblaje de glicoconjugados de superficie en diversas bacterias. (Graninger et al., 1999; <https://www.uniprot.org/uniprot/P55463>). Se ha determinado que estos glicoconjugados de superficie o polisacáridos extracelulares (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0045226>) son esenciales para la supervivencia de bacterias, para las interacciones bacteria-hospedero, y se ha observado que presentan diversidad estructural en las especies bacterianas debido a variaciones de los componentes azúcares, enlaces y sustituciones (Graninger et al., 1999). La dTDP-L-rhamnosa es el precursor de la L-Rhamnosa (L-Rha), un componente del lipopolisacárido *core* y de varios polisacáridos del antígeno O de *Pseudomonas*

(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR005913/>). Asimismo, en *Azospirillum* es muy importante para la biosíntesis de su LPS core, producción de exopolisacáridos y colonización de la raíz de plantas (Jofré et al., 2004). Se ha estudiado que en grampositivos esta enzima actúa en la formación del glucano de las glucoproteínas de la capa S y que las especies ambientales parecen adaptarse a las condiciones alteradas del ambiente cambiando las proteínas de su capa S (Graninger et al., 2002). Esta enzima ha sido encontrada en diversas bacterias tanto patógenas como ambientales (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=dTDP-4-dehydrorhamnose+reductase&sort=score>), entre ellas en *Acidithiobacillus* spp. (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=dTDP-4-dehydrorhamnose%20reductase%20AND%20organism:%22Acidithiobacillus%22&sort=score>).

Esta enzima está codificada en el plásmido pAfPQ510-1 de *A. ferrivorans* PQ510, y es 94% idéntica, con Evalúe 0, a una dTDP-4-dehidrorhamnosa reductasa del genoma de *A. ferrivorans* SS3 (Nº Acceso WP\_014030331.1) codificada por el gen denominado *rmID*. No hay otros reportes en plásmidos.

#### ● **Decaprenilfosforil-beta-D-ribosa oxidasa**

Es una flavo enzima codificada por el gen *dprE1*, que cataliza el segundo paso de la epimerización de decaprenil-fosfo-ribosa (DPR) a decaprenil-fosfo-arabinosa (DPA), un precursor clave que sirve como donador de arabinosa necesario para la síntesis de arabinanos de la pared celular de micobacterias y biosíntesis de polisacáridos capsulares (Brecik et al., 2015) (<https://www.uniprot.org/uniprot/A0R607>). Se ha encontrado frecuentemente en bacterias grampositivas y en algunas gramnegativas, como *Pseudomonas* (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=dprE1&sort=score>). La DprE1 predicha en el plásmido pAfPQ510-1 de *A. ferrivorans* PQ510 tiene 57.45% de identidad y un Evalúe de 6.00E-27 a una oxidasa ligada a FAD de *Acidithiobacillus caldus* y *A. ferrivorans* (Tabla 5). Podría ser importante para la síntesis de exopolisacáridos en esta bacteria.

### © **Tirosina recombinasa XerD**

Es una proteína miembro de la familia de tirosina recombinasas que cataliza reacciones de intercambio de hebras de DNA (Hallet et al., 1999). En *E.coli* se ha estudiado bien el sistema Xer que está compuesto por XerC y XerD, que son recombinasas específicas de sitio. La función principal de la recombinación Xer es convertir dímeros del cromosoma bacteriano o multímeros de plásmidos multicopia en monómeros para permitir su segregación en la división celular (Hallet et al., 1999; Rajeev et al., 2009). En *Vibrio cholerae* se encontró que las tirosina recombinasas Xer permiten la integración de elementos móviles integrativos a su cromosoma (Das et al., 2013). También se les ha encontrado como proteína regulatoria de fimbria, que controla la variación de fase de las fimbrias en bacterias, mediando la inversión periódica de un segmento de DNA que porta el promotor del gen estructural de la fimbria (<https://www.uniprot.org/uniprot/P0ADH5>). Su función biológica es responder a estímulos que dañan el DNA, que podrían provenir del ambiente (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0006974>).

La XerD predicha en los plásmidos pAfPQ510-1 y pAfPQ510-2 de *A. ferrivorans* PQ510 tiene 82.59 y 87.45% de identidad y un Evalúe de 4.00E-119 y 2.00E-148, respectivamente, a una proteína de replicación y a una proteína regulatoria de fimbria tipo 1 de *Acidithiobacillus thiooxidans* (Tablas 5 y 6).

### © **Proteína HU de unión a DNA**

Es una proteína de unión a DNA similar a histona en bacterias, que es capaz de envolver el DNA para estabilizarlo y así evitar su desnaturalización en condiciones ambientales extremas (<https://www.uniprot.org/uniprot/P9WMK6>). Estas proteínas son omnipresentes en bacterias, arqueas y algunos eucariotes; se unen a DNA de doble hebra sin especificidad de secuencia, pero con afección a estructuras como horquillas, nicks, protuberancias (Kamashev et al., 2017). La proteína HU (gen *hup*) predicha en los plásmidos pAfPQ510-1 y pAfPQ510-2 de *A. ferrivorans* PQ510 tiene 55 y 100% de identidad y un Evalúe de 6.00E-15 y 9.00E-71, respectivamente, a una proteína de la

familia HU de *Desulfovibrio alkalitolerans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus caldus* (Tablas 5 y 6). Podría cumplir la función de estabilizar el DNA en condiciones de estrés ambiental.

#### ● **Proteína iniciadora de la replicación RepB**

Es una proteína iniciadora de la replicación en círculo rodante codificada en plásmidos, virus y algunos protozoarios, se ha estudiado detalladamente en el plásmido promiscuo pMV158 de *Streptococcus agalactiae* (Boer et al., 2016). Se ha encontrado en plásmidos de diversas bacterias tanto grampositivas como gramnegativas (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=RepB&sort=score>).

La proteína RepB predicha en el plásmido pAfPQ510-1 de *A. ferrivorans* PQ510 tiene 94.87% de identidad y un Evalúe de 0 a una proteína iniciadora de replicación de plásmido de la familia RepB de *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Polaromonas sp.* (Tabla 5).

#### ● **Proteína de segregación ParB**

Los genes denominados *parA* y *parB* están codificados en muchos plásmidos de bajo número copias y en cromosomas bacterianos. Interactúan con uno o más sitios que actúan en *cis* llamados centrómeros para asegurar mejor la segregación de la molécula de DNA que los codifican. Par B se une al sitio ParS del replicón (Bignell and Thomas, 2001; Rodionov and Yarmolinsky, 2004).

La proteína ParB predicha en el plásmido pAfPQ510-1 de *A. ferrivorans* PQ510 tiene 95.71% de identidad y un Evalúe de 1.00E-40 a una proteína de segregación ParB de *Acidithiobacillus thiooxidans* y de *Xanthomonas axonopodis* (Tabla 5).

#### ● **ATPasa de segregación Soj**

Soj es una proteína homóloga a ParA; Soj es denominada así por su participación en la segregación del cromosoma de *Bacillus subtilis* durante la esporulación, pero se han encontrado proteínas homólogas a ésta en diversas bacterias que no producen esporas (Leonard et al., 2005). Las proteínas de la superfamilia ParA son ATPasas tipo Walker (motivo

KGGxxK{T/S}, un loop que interactúa con los fosfatos de ATP y ADP), muy comunes y únicas en procariotes que se ensamblan en el segregasoma maduro (Hayes y Barillà, 2010; Baxter y Funnell, 2015). The segregasoma es el complejo de nucleoproteínas que impulsan la segregación precisa de plásmidos durante la división celular. El complejo incluye típicamente: (i) una secuencia análoga a centrómero en el cual ocurre el ensamblaje del segregasoma; (ii) una de una amplia gama de proteínas de unión al DNA, reconoce específicamente su centrómero y forma una estructura de nucleoproteína de arquitectura específica; y (iii) una proteína de unión a ATP, ya sea similar a actina o, más comúnmente, una ATPasa tipo Walker de la superfamilia ParA, que se ensambla a la estructura anterior (Hayes y Barillà, 2010).

La proteína Soj predicha en el plásmido pAfPQ510-1 de *A. ferrivorans* PQ510 tiene 91.87% de identidad y un Evalue de 4.00E-134 a una proteína ATPasa de segregación de la familia AAA de *Pseudomonas aeruginosa*, *Tepidicella xavieri* y *Xantomonas axonopodis* (Tabla 5).

Se plantea que las proteínas Soj (superfamilia ParA) y ParB predichas en pAfPQ510-1, al estar ubicadas juntas una después de la otra (Fig. 5), y tener actividades de segregación, estarían conformando el operón del segregasoma de este plásmido.

### © DNA invertasa Hin

Es una proteína DNA invertasa de la subclase de las serino recombinasas, son generalmente controladas por complejos de nucleoproteínas (McLean et al., 2013). Las resolvasas/invertasas son enzimas que comparten las siguientes características estructurales: un dominio aminoterminal catalítico y de dimerización que contiene un residuo de serina conservado involucrado en la unión covalente transitoria al DNA, y un dominio carboxiloterminal hélice-vuelta-hélice de unión a DNA (Garnier et al., 1987) (<https://prosite.expasy.org/doc/PS51736>). Estas enzimas han sido bastante estudiadas en *Salmonella enterica* por su actividad de invertasa en la variación de fase de la flagelina (Koskiniemi et al., 2013), también en *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* (genoma y plásmidos), *Clostridium perfringens*, *Bacillus subtilis*, bacteriófagos Mu, y transposones

(<https://prosite.expasy.org/doc/PS51736>). La enzima Hin predicha en el plásmido pAfPQ510-1 de *A. ferrivorans* PQ510 tiene 99.46% de identidad y un Evalúe de 8.00E-130 a una proteína resolvasa/invertasa de *Acidithiobacillus thiooxidans* (Tabla 5).

En el plásmido pTF5 de *Acidithiobacillus ferrooxidans* se han reportado las proteínas ResA e InvA que son invertasas con secuencias aminoacídicas altamente conservadas a Hin (Dominy et al., 1998). Estas invertasas están involucradas con la variación de fase y la variación antigénica de las bacterias. Ambos mecanismos son usados por las especies bacterianas para generar diversidad intra-poblacional, para adaptarse al nicho, o para escapar de las defensas del hospedero (Wisniewski-Dyé y Vial, 2008). Mediante este proceso adaptativo, las bacterias experimentan cambios fenotípicos frecuentes y generalmente reversibles como resultado de alteraciones genéticas o epigenéticas en loci genéticos específicos (Wisniewski-Dyé y Vial, 2008). Se ha encontrado que *Acidithiobacillus ferrooxidans* experimenta variación de fase respecto a la oxidación de hierro y al fenotipo *swarming* de las colonias. Así, se conoce que esta especie usa hierro y compuestos azufrados para obtener energía, pero se han observado variantes con colonias que se diseminan rápidamente en medio sólido (LCS “*large spreading colony*”) que contiene ión ferroso y tiosulfato, que han perdido la capacidad de oxidar el ión ferroso pero que retienen la capacidad de oxidar el sulfuro y que podrían revertir al fenotipo parental (Schrader y Holmes, 1988; Wisniewski-Dyé y Vial, 2008). Invertasas como Hin u otras recombinasas como XerD predichas en el plásmido pAfPQ510-1 de *A. ferrivorans* PQ510 podrían cumplir una función importante en la adaptación de esta especie bacteriana al ambiente extremo en que habita.

## ● Toxina RelE2

Se ha reportado que los plásmidos que poseen un sistema Toxina-Antitoxina (TA) son más persistentes en ausencia de presión de selección, en comparación con los plásmidos carecen de un sistema TA, puesto que los sistemas TA estabilizan los plásmidos en sus hospederos matando a las células hijas que no los heredan (Pal et al., 2015; Hernández-Ramírez

et al., 2018). Los sistemas TA están diseminados entre los plásmidos de bajo número de copias para su propagación estable en la población bacteriana, pero al descubrirse también numerosos sistemas TA en el cromosoma de las bacterias, se pensó que podían cumplir un papel más amplio en la fisiología bacteriana (Bukowski et al., 2017). Se ha descrito que los sistemas TA están involucrados en la respuesta al estrés ambiental, en la inducción de dormancia, en la replicación, en la síntesis de pared celular, en la formación de biopelículas y en la regulación de la expresión de genes incluyendo los de virulencia (Bukowski et al., 2017; Wen et al., 2014; Bukowski et al., 2013; Marakova et al., 2009; Gerdes et al., 2005). Actualmente se conocen 6 tipos de sistemas TA (I a VI) que se distinguen sobre la base de la naturaleza de la antitoxina (si es RNA o proteína) y su mecanismo de acción, mientras que el componente toxina es una proteína, en todos los casos (Wen et al., 2014; Unterholzner et al., 2013; Page y Peti, 2016). En los sistemas de tipo I y III las antitoxinas son RNA pequeños no codificantes (sRNA), en tanto que en los tipos II, IV, V y VI las antitoxinas son proteínas (Kopfmann et al., 2016).

Los sistemas TA también se clasifican como súperfamilias de toxinas independientes y súperfamilias de antitoxinas independientes (Bustamante et al., 2014). La toxina RelE2 está comprendida en la súperfamilia de toxinas RelE/ParE, que está organizada en operones *relBE* y *parDE*, donde *relB* y *parD* codifican antitoxinas, en tanto que *relE* y *parE* codifican toxinas (Fiebig et al., 2010). La toxina RelE2 predicha en el plásmido pAfPQ510-1 de *A. ferrivorans* PQ510 tiene 94.85% de identidad y un Evalúe de 2.00E-60 a una toxina RelE2 de *A. thiooxidans* (Tabla 5). Asimismo, tiene una identidad mayor al 90% con la toxina ParE de *A. ferrivorans* (<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A1C2IEN0>). RelE predicha en el plásmido pAfPQ510-2 de *A. ferrivorans* PQ510 tiene 97.75% de identidad y un Evalúe de 5.00E-54 a una toxina RelE de *A. thiooxidans* y *Thioalkalivibrio sulfidiphilus* (Tabla 6). RelE predicha en el plásmido pAfPQ510-3 de *A. ferrivorans* PQ510 tiene 98.11% de identidad y un Evalúe de 2.00E-69 a una toxina RelE de *A. thiooxidans* y *Burkholderia ferrariae* (Tabla 7). En el sistema toxina-antitoxina RelBE2, que pertenece al tipo II, RelE2 es la toxina y RelB2 es la antitoxina (Xu et al., 2018). Estos



sistemas generalmente se organizan en un operón de dos genes, donde el primero codifica la antitoxina, que es una proteína pequeña y lábil (65–85 aa) y el segundo codifica la toxina, una proteína grande y estable (95–135 aa) (Agarwal et al., 2007). Cuando la bacteria pierde el plásmido durante un evento segregacional, la antitoxina es degradada por las proteasas celulares de manera que la toxina está libre para su actividad de efecto letal. Así, estos sistemas están involucrados en el mantenimiento estable de los plásmidos porque las células los requieren para una constante síntesis *de novo* de la antitoxina por ser una proteína lábil y esencial para la supervivencia celular (Agarwal et al., 2007). La antitoxina de los sistemas tipo II usualmente tiene dos funciones: i) se une a la toxina para evitar su efecto dañino, y ii) la antitoxina sola o formando un complejo con la toxina se une a su propio operón para ejercer una autorregulación transcripcional (Chopra et al., 2013).

Se ha investigado la distribución y funcionalidad de los sistemas TA de tipo II en *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Bustamante et al., 2014). Se ha considerado que estos sistemas se mueven de un genoma a otro por transferencia horizontal de genes puesto que están localizados en plásmidos y otros elementos genéticos móviles como transposones y súperintegrones y que los sistemas TA codificados en el cromosoma pueden cumplir con la función de estabilización de fragmentos genómicos grandes y de elementos conjugativos integrativos (ICEs) (Bustamante et al., 2014). Estos investigadores encontraron que *A. ferrooxidans* tiene en su cromosoma un alto número de sistemas TA (28-29), al igual que otros microorganismos ambientales, y que en 20 de ellos la toxina es una ribonucleasa. Están codificados cerca a elementos genéticos móviles. Cuatro de estos sistemas TA estaban codificados en el elemento móvil ICEAfe1 de *A. ferrooxidans* cepa ATCC 23270 y dos de ellos eran funcionales en *E. coli*. Asimismo, demostraron que estos sistemas TA tenían capacidad de mantenimiento de plásmidos. Todos los sistemas TA encontrados estaban cerca a elementos genéticos móviles, 6 de éstos son toxinas de la súperfamilia RelE/ParE. Los investigadores proponen que la mayoría de los sistemas TA pueden pertenecer a elementos genéticos

móviles activos o inactivos insertados en el cromosoma y que podrían estar involucrados en el mantenimiento de ellos (Bustamante et al., 2014).

En cuanto a publicaciones sobre sistemas TA en plásmidos naturales de *Acidithiobacillus* solamente hay una, en el plásmido pTF-FC2 de *A. ferrooxidans*, en el que se halló un sistema que denominaron *pas* (*plasmid addiction system*) conformado por 3 genes. *pasA*, *pasB* y *pasC*, que codificaban una antitoxina, toxina, y una proteína que incrementaba la capacidad de la antitoxina para neutralizar a la toxina, respectivamente (Smith y Rawlings, 1997). Se demostró que la función de este sistema, aunque estaba insertado en la región de replicación del plásmido, no estaba relacionada al rango de huéspedes ni al número de copias del plásmido sino a su mantenimiento estable (Smith y Rawlings, 1997).

Marakova et al. (2009) señalan que los sistemas TA de tipo II podrían estar cumpliendo una función de respuesta al estrés en procariotes. Así, se ha observado que la mayoría de los microorganismos que tienen muchos sistemas TA son aquéllos que crecen en ambientes escasos de nutrientes y/o son quimiolitoheterótrofos (Bustamante et al., 2014). Se sabe actualmente que los sistemas TA tienen una función general en la regulación de la respuesta al estrés y que sistemas diferentes detectan estímulos diversos y actúan como reguladores globales de la expresión de genes (Bukowski et al., 2013). Así, cuando la bacteria crece en condiciones favorables los genes de los sistemas TA se co-expresan de manera tal que la antitoxina evita la actividad dañina de la toxina, pero, en situaciones desfavorables se altera el balance toxina/antitoxina, generalmente debido a la inducción de la degradación proteolítica de la antitoxina lábil. La toxina activa induce al estado de dormancia u otras adaptaciones que capacitan a la bacteria a sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables (Bukowski et al., 2013).

Marakova et al. (2009) señalan que la expresión de la toxina puede ser regulada extrínsecamente. Así, se ha demostrado que una antitoxina cromosomal tenía efecto inhibitorio sobre una toxina plasmídica (Saavedra et al., 2008). Se ha encontrado que es muy frecuente el hallazgo de solo toxinas o solo antitoxinas, por ejemplo, las antitoxinas ArsR, MerR y HicA

han sido encontradas solas en un 90, 65 y 30%, respectivamente, en el genoma de procariotas (Marakova et al., 2009). También podría ser que cuando las toxinas o antitoxinas están solas, es porque están cumpliendo funciones diferentes a las de TA, tal como la regulación transcripcional de diversos operones, como es el caso de las antitoxinas “más estables” ArsR o MerR.

Actualmente, se afirma que los sistemas TA pertenecen al moviloma procariótico porque se diseminan preferentemente por transferencia horizontal de genes mediada por plásmidos (Marakova et al., 2009). Sin embargo, hay muy pocos estudios realizados sobre estos sistemas en plásmidos de *Acidithiobacillus*, la única publicación al respecto es de Smith y Rawlings (1997), por lo que este estudio está aportando nuevos hallazgos sobre el tema.

#### ● **Sistema toxina – antitoxina MqsR/MqsA**

Los genes de toxina-antitoxina (TA) son pequeños módulos genéticos que codifican una toxina y una antitoxina. Las toxinas inhiben la proliferación celular o viabilidad, y las antitoxinas neutralizan esta inhibición. La toxina (siempre una proteína) es el componente estable y la antitoxina (una proteína o un RNA regulatorio) es menos estable, y esta estabilidad diferencial juega un papel importante en la activación condicional de los sistemas TA (Hernández-Arriaga et al., 2015).

El sistema MqsR/MqsA (*motility quorum sensing regulator*) es un sistema de tipo II (toxina y antitoxina son proteínas), en el que MqsR es la toxina y MqsA es la antitoxina; asimismo, es un sistema no canónico en el sentido que el gen de la toxina precede al de la antitoxina en el operón (Fraikin et al., 2019).

La función que cumple este sistema en las bacterias donde se ha encontrado es controversial. Por un lado, se ha determinado que este sistema tiene un papel importante en la persistencia celular, formación de biopelícula y regulación de una proteína de estrés en la cepa *Pseudomonas putida* KT2440 (Sun et al., 2017). Similarmente, en *E. coli* se ha encontrado que el sistema MqsR/MqsA es importante para el crecimiento celular y

tolerancia durante el estrés que generan las sales biliares (Kwan et al., 2015). En esta especie, también se ha demostrado que este sistema regula a otro sistema TA, cual es GhoT/GhoS que es un sistema tipo V (toxina es proteína y antitoxina es una RNasa específica que cliva el mRNA de la toxina) (Wang et al., 2013). Por otro lado, sin embargo, se ha demostrado que MqsR/MqsA no contribuye ni a la regulación de la formación de biopelícula ni a la sensibilidad al estrés oxidativo ni a las sales biliares, y que, debido a que son tan diversos y abundantes, hay que estudiarlos con los estándares debidos (Fraikin et al., 2019).

Bustamante et al. (2014), que realizaron un estudio de los sistemas toxina-antitoxina en el genoma móvil de *A. ferrooxidans*, no encontraron este sistema. Tampoco hay publicaciones al respecto en otras especies de *Acidithiobacillus*, pero sí hay reportes de MqsR/MqsA en la base de datos Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), así, se ha detectado tanto la toxina MqsR como la antitoxina MqsA en *A. thiooxidans*, *A. ferrivorans* SS3 y en *Acidithiobacillus* sp. de drenaje ácido de mina (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=mqsR%20AND%20organism:%22Acidithiobacillus%22&sort=score>; <https://www.uniprot.org/uniprot/?query=mqsa+organism%3Aacidithiobacillus&sort=score>).

El sistema MqsR/MqsA predicho en el plásmido pAfPQ510-1 de *A. ferrivorans* PQ510 tiene 75% de identidad y un Evalue de 2.00E-38 a MqsR de *Sterolibacterium denitrificans*, y 80.45 % de identidad y un Evalue de 2.00E-78 a MqsA de *Azotobacter chroococcum* (Tabla 5).

### © Subunidad metilasa YeeA

Es una proteína con actividad de metilasa de un sistema de modificación/restricción tipo II, que se ha encontrado en plásmidos de otras bacterias, como *Micrococcus* sp. cepa V7 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/17373406>; N° acceso KF577591), aislada de la laguna Vilama en la puna argentina que se encuentra a una altitud de 4600 m.s.n.m. (Dib et al., 2013). También se ha reportado en diversas bacterias incluyendo *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377 y

*A. caldus* cepas ATCC 51756 y SM-1 (The Uniprot Consortium, 2019; <https://www.uniprot.org/>).

La metilasa YeeA predicha en el plásmido pAfPQ510-2 de *A. ferrivorans* PQ510 tiene 61.9% de identidad y un Evalúe de 0 a YeeA de *Thermomonas haemolytica* y *Lysobacter concretiois* (Tabla 6).

#### © **Regulador transcripcional de la familia MarR**

La familia de proteínas MarR (*Multiple Antibiotic Resistance Regulator*) son reguladores transcripcionales codificados en bacterias y arqueas, son abundantes en organismos de vida libre y de genoma grande, y de acuerdo con esta tendencia, los homólogos de MarR cumplen funciones fisiológicas como sensores de cambios ambientales (Grove, 2013). Por ejemplo, en *E. coli* se ha determinado que MarR regula un operón que codifica una bomba de eflujo de drogas. Generalmente, los homólogos de MarR regulan la actividad de genes involucrados en respuesta al estrés, virulencia, o degradación o exportación de sustancias químicas dañinas. En muchas de estas proteínas, se desconoce los ligandos a los cuales ellas responden (Grove, 2013).

El regulador transcripcional de la familia MarR predicho en el plásmido pAfPQ510-2 de *A. ferrivorans* PQ510 tiene 100% de identidad y un Evalúe de  $7.00E-35$  a una proteína de esta familia en *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* (Tabla 6).

#### © **Proteína de movilización MobA**

Pertenece a la familia de proteínas de movilización MobA/MobL, esencial para la transferencia del plásmido que la codifica. Incluye a la proteína MobA del plásmido RSF1010 de *E. coli* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=332099>), a la proteína MobL del plásmido PTF1 de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Drolet y Lau, 1992) y a la proteína TraA (relajasa para la transferencia conjugativa del plásmido Ti) que contiene dominios distintivos de una exonucleasa de hebra simple (pfam03389) como también dominio de una helicasa (TIGR02760). Esta proteína probablemente cumple la misma function que TraI (F), cortando (nicking) en el sitio oriT y desenrollando el plásmido antes

de la transferencia conjugativa (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/TIGR02768>), (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR005053>). También se ha demostrado que la proteína MobA, codificada en el plásmido de amplio rango de huéspedes R1162, es requerida para la movilización conjugativa de este plásmido. La proteína es una parte esencial del relajosoma, y también es necesaria para la terminación de la transferencia de la hebra (Bhattacharjee y Meyer, 1993). Una secuencia codificante de proteína de la familia MobA/MobL también se ha encontrado en los plásmidos pTcM1, pTcF1 y pC-SH12 de *Acidithiobacillus caldus* (van Zyl et al., 2008). La proteína MobA predicha en el plásmido pAfPQ510-2 de *A. ferrivorans* PQ510 tiene 53.30% de identidad y un Evalúe de 0 a una proteína de la familia MobA/MobL de *Acidithiobacillus ferrivorans* (Acceso: WP\_087455011.1) y es similar a un gen ortólogo (Evalúe 2.9E-109) con producto proteico de la familia MobA/MobL de *Acidithiobacillus thiooxidans* (Tabla 6).

#### ● **Proteína DNA relajasa MbeA**

MbeA es una proteína de movilización, es una enzima con actividad de relajasa o “nickasa” del plásmido ColE1 de *E. coli*, movilizable por plásmidos conjugativos. En este plásmido, se demostró que MbeA interactúa con la proteína MbeC formando un complejo y que tiene afinidad por DNA de hebra simple (Varsaki et al., 2012).

Las relajasas se requieren para la transferencia horizontal de la información genética contenida en los plásmidos durante la conjugación bacteriana. La relajasa, junto con varias proteínas auxiliares, forma el complejo de relajación o relajosoma (Byrd y Matson, 1997; <http://pfam.xfam.org/family/Relaxase>). Las relajasas catalizan el corte específico de una de las hebras del DNA en el sitio oriT y la hebra clivada se transfiere a la célula receptora (Varsaki et al., 2003; <https://www.uniprot.org/uniprot/P13658>).

Se ha reportado en diversas especies bacterianas, pero no en *Acidithiobacillus*, hasta la fecha (The UniProt Consortium, 2019; <https://www.uniprot.org>).

La proteína MbeA predicha en el plásmido pAfPQ510-3 de *A. ferrivorans* PQ510 tiene 46.20% de identidad y un Evalúe de 1.00E-94 a una proteína de *Desulfobacter hydrogenophilus* (Tabla 7).

#### ● **Antitoxina Phd**

Phd (*prevents host death*) es la antitoxina del módulo toxina-antitoxina (TA) Doc/Phd, donde Doc (*death on curing*) es la toxina; se descubrió que ayudaba al mantenimiento del plásmido-profago P1 de *Escherichia coli* (García-Pino et al., 2008). Doc es un inhibidor de la elongación de la traducción a través de su asociación con la subunidad ribosomal 30 S de una manera similar al antibiótico higromicina. La acción de Doc es suprimida por la antitoxina Phd, que consta de dos dominios. Su dominio C-terminal (residuos 52-73) alberga el sitio de interacción con Doc y por sí solo previene la detención del crecimiento mediada por Doc. La región N-terminal (residuos 1-51) de Phd es un dominio de dimerización / unión al DNA que se une al sitio del operador del operón phd/doc. Phd forma un complejo heterotrimérico con Doc. La unión al operador y represión del operón phd/doc por Phd son reforzados por la presencia de Doc de manera cooperativa (García-Pino et al., 2008).

El sistema TA Doc/Phd se ha reportado en varias especies bacterianas como *E. coli*, *Mycobacterium* sp. y *Vibrio cholerae* (en un superintegrón) (The UniProt Consortium, 2019; <https://www.uniprot.org>; Guérout et al., 2013). En *Acidithiobacillus ferrivorans* se ha reportado las antitoxinas Phd-1, Phd-2 y StbD-1 de la superfamilia de antitoxinas Phd, que al parecer estarían actuando con toxinas no identificadas, VapC y RelE, respectivamente (Bustamante et al., 2014).

La antitoxina Phd predicha en el plásmido pAfPQ510-3 de *A. ferrivorans* PQ510 tiene 62% de identidad y un Evalúe de 1.80E-61 a una proteína no caracterizada de *Ferroplasma* sp. cepa Z-31 (Tabla 7).

#### ● **Proteína SinR**

Es una proteína reguladora transcripcional tipo HTH (hélice-vuelta-hélice), que en el modelo de *Bacillus subtilis*, se ha demostrado que es el regulador principal que determina el cambio de un estilo de vida libre o planctónico a



formar una biopelícula (Newman et al., 2013). La formación de una biopelícula protectora es el mecanismo más robusto que permite a las bacterias sobrevivir en ambientes hostiles, puesto que las células bacterianas están incrustadas dentro de una matriz que se compone de una mezcla compleja de biomoléculas que se denomina colectivamente sustancia polimérica extracelular o EPS (Draughn et al., 2017). Dicha mezcla compleja está constituida por diversos exopolisacáridos, proteínas, DNA extracelular y otros compuestos (Gunn et al., 2016).

La transición fenotípica de un estado planctónico a una biopelícula, en *B. subtilis*, está regulada por la actividad del represor transcripcional, SinR, a través de su inactivación por su antagonista primario, SinI (Draughn et al., 2017). La actividad de SinR está controlada también por otros antagonistas, SlrA y SlrR. La interacción de estas cuatro proteínas (SinR, SinI, SlrA y SlrR) forma un interruptor, que determina si SinR puede o no inhibir la formación de biopelículas mediante la represión de varios operones asociados a la matriz extracelular (Newman et al., 2013).

SinR ha sido reportado en diversas especies bacterianas, mas no en *Acidithiobacillus* hasta la fecha.

La proteína reguladora transcripcional SinR predicha en el plásmido pAfPQ510-3 de *A. ferrivorans* PQ510 tiene 97.20% de identidad y un Evalue de 4.30E-41 a una proteína SinR de Candidatus *Accumulibacter* sp. SK-02 (Tabla 7).

### ● **Proteína DpnA**

Es una enzima de modificación DNA metilasa, que pertenece al sistema de restricción-modificación (RM) DpnII. La metilasa es esencial para el establecimiento de un plásmido previamente no metilado transformado en la célula como DNA monocatenario. Reconoce la secuencia GATC en una o las dos hebras, causa la metilación específica en A y protege el DNA del corte por la endonucleasa DpnII (de la Campa et al., 1987). El sistema de RM DpnII incluye una enzima de restricción y dos metilasas: una que metila DNA de doble hebra y otra que metila DNA de hebra simple, que es DpnA, la cual solamente se expresa durante el estado de competencia. Esto se ha demostrado en *Streptococcus pneumoniae* (De Ste Croix et al., 2017;

Johnston et al., 2013). Es conocido que la función primaria de la metilación de DNA por los sistemas de RM, es permitir la distinción entre el DNA propio y el foráneo; sin embargo, también puede tener otros efectos. De hecho, cuando se agrega un grupo metilo a una base, la estructura y la dinámica de la molécula de DNA se alteran, lo que a su vez resulta en cambios en las interacciones DNA-proteína, que se sabe que pueden regular la expresión génica (De Ste Croix et al., 2017).

La metilasa DpnA ha sido reportada en diversas especies bacterianas, incluyendo en metagenoma de drenaje ácido de mina (<https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/OIR06245>), mas no en *Acidithiobacillus* hasta la fecha (The UniProt Consortium, 2019; <https://www.uniprot.org>).

Esta enzima DpnA predicha en el plásmido pAfPQ510-3 de *A. ferrivorans* PQ510 tiene 92.52% de identidad y un Evalúe de 1.00E-175 a una enzima similar (DNA metiltransferasa específica de sitio del sistema de RM DpnII) de *Pseudomonas aeruginosa* y *Xanthomonas campestris* (Tabla 7).

### ● **Proteínas hipotéticas**

El plásmido pAfPQ510-1 de *A. ferrivorans* PQ510 tiene 28 secuencias codificantes de proteínas hipotéticas (Tabla 2), algunas de las cuales tienen identidad a dominios que se encuentran: 1) en proteínas que transportan electrones acoplado a hidrólisis de ATP (producción y conversión de energía), 2) en oxidorreductasas y enzimas para la biosíntesis de ubiquinona (transporte de electrones), 3) en proteínas relacionadas con la replicación, recombinación y reparación de DNA, y con la segregación de plásmidos, 4) en sistemas TA, y 5) en metalo-endopeptidasas (que en *Deinococcus* son reguladores centrales de reparación de DNA dañado) (<http://pfam.xfam.org/family/PF06114>; The UniProt Consortium, 2019; <https://www.uniprot.org>) (Tabla 5).

El plásmido pAfPQ510-2 tiene 15 secuencias codificantes de proteínas hipotéticas (Tabla 3), algunas de las cuales tienen identidad a dominios que se encuentran: 1) en represores transcripcionales que regulan el número de copias del plásmido (CopG) (<https://www.uniprot.org/uniprot/P13920>),

que regulan sistemas sensores LRS (*LytTR Regulatory Systems*) que controlan conjuntamente la expresión del gen de bacteriocina, el desarrollo de la competencia natural, así como una vía de muerte celular (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR007492/>), 2) en sistemas TA, 3) en proteínas relacionadas con la replicación, recombinación y reparación de DNA, 4) en proteínas integrales de membrana transportadoras probablemente de azufre y/o selenio (YeeE/YedE) (Zou et al., 2018; <http://www.tcdb.org/search/result.php?tc=9.B.102>), 5) en quinasas y 6) en proteínas de unión a ligando (YfbU) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/PF03887>) (Tabla 5).

El plásmido pAfPQ510-3 tiene 10 secuencias codificantes de proteínas hipotéticas (Tabla 4), algunas de las cuales tienen identidad a dominios que se encuentran: 1) en proteínas de interacción proteína-proteína (dominio F-box) (Kipreos y Pagano, 2000), 2) en proteínas relacionadas con la replicación, recombinación y reparación de DNA, 3) en proteínas de movilización de plásmidos (MobC) y 4) en oxidorreductasas (Tabla 6).

## 6.2 Caracterización molecular y genómica del plásmido de *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506

En el DNA plasmidial extraído se encontró un plásmido, pAfPQ506-1, de un tamaño de 14204 pb. El hallazgo de un plásmido concuerda con una investigación anterior (Eca, 2016) que muestra, mediante electroforesis (Fig. 3), que la cepa *A. ferrooxidans* PQ506 presenta un solo plásmido de un tamaño > 12,000pb.

Existen varias publicaciones sobre el hallazgo de plásmidos en esta especie. Mao et al. en 1980, fueron los primeros en extraer plásmidos, reportando cinco denominados pTF1 hasta pTF5 de 21.32, 40.06, 2.70, 2.51 y 2.37 x10<sup>6</sup> daltons (correspondiente a 32800, 61630, 4154, 3862 y 3646 pb), sin realizar una caracterización genética (Mao et al., 1980). Se ha tratado de determinar si los plásmidos de *A. ferrooxidans* estaban involucrados en la resistencia a metales específicos. Así, Martin et al. (1983) concluyeron que un plásmido de 20 kb

estaba asociado a la resistencia al uranio porque estaba presente en las cepas resistentes y ausente en las cepas sensibles y además porque una cepa resistente se volvió sensible en la cual no pudieron detectar el plásmido. Visca et al. (1986) consideraron que un plásmido de 28.5 kb estaba involucrado con la resistencia al mercurio y a la plata en algunas cepas de esta especie bacteriana. Pramila et al. (1996), demostraron que tres plásmidos de *A. ferrooxidans* no estaban asociados a la resistencia al cobre y mercurio porque el número de copias de éstos disminuía cuando la cepa crecía en altas concentraciones de los metales. Kondrat'eva et al. (2002), estudiaron la influencia del crecimiento de *A. ferrooxidans* en presencia y ausencia de metales  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  sobre el perfil de plásmidos, resultando que éstos cambiaban. Sin embargo, en estas investigaciones no se ha profundizado en las características genéticas de los plásmidos.

Más bien, Rawlings et al. (1984) sí realizaron estudios moleculares en el plásmido pTF-FC2 de 12.4 kb, de una cepa de *A. ferrooxidans* con elevada resistencia al arsénico, demostrando, mediante clonación molecular para su expresión en *E. coli*, que este plásmido no confería tal resistencia. Asimismo, demostraron que el origen de replicación de pTF-FC2 era funcional en *E. coli* (Rawlings et al., 1984). También se construyeron plásmidos recombinantes de *A. ferrooxidans* con capacidad de replicación en *E. coli*, comprobando que dichos plásmidos no eran responsables de la resistencia de la bacteria a  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{As}^{3+}$ ,  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  (Rawlings et al., 1986). Otro grupo de investigadores clonaron fragmentos de plásmidos de *A. ferrooxidans* que portaban determinantes de resistencia al  $\text{Cu}^{2+}$  y los transformaron en *E. coli*, concluyendo que no conferían resistencia a este metal y por, el contrario, uno de los plásmidos recombinantes disminuyó la tolerancia al  $\text{Cu}^{2+}$  de *E. coli* (Chisholm et al., 1998).

Por otro lado, se han investigado otros aspectos de los plásmidos de *A. ferrooxidans*, como la detección de un transposón que portaba un gen regulador de resistencia al mercurio en el plásmido pTF-FC2, pero no el gen de la mercurio reductasa ni los genes de resistencia a arsénico (Rawlings et al., 1993; Clennel et al., 1995), también se ha demostrado que el origen de replicación, de transferencia y los genes de movilización de este plásmido se

expresaban en *E. coli* (Rawlings y Wood, 1985). Asimismo, pTF-FC2 porta un sistema toxina-antitoxina (Smith y Rawlings, 1997; Smith y Rawlings, 1998a y 1998b; Rawlings 1999), se ha caracterizado su región de movilización (Rohrer y Rawlings, 1992) e investigado profundamente su región de replicación (Dorrington y Rawlings, 1989; Dorrington y Rawlings, 1990; Dorrington et al., 1991; Gardner y Rawlings, 2004; Matcher y Rawlings, 2009). Estudios similares se han realizado con el plásmido pTF1 determinando que tenía genes de movilización *mobL* y *mobS* (Holmes et al., 1984; Drolet et al., 1990; Drolet y Lau, 1992). Analizando el plásmido pTFI91, comúnmente distribuido entre las cepas de *A. ferrooxidans*, se encontró que su origen de replicación no funcionaba en *E. coli* ni en *Pseudomonas putida* (Chakravarty et al., 1995).

Como se puede apreciar, el primer plásmido de *A. ferrooxidans* que ha sido ampliamente secuenciado y caracterizado a lo largo de varios estudios es pTF-FC2, pero en cuanto a plásmidos totalmente secuenciados, el primero fue pTF4.1 en marzo de 1996, y el segundo pTF5 en octubre del mismo año. Actualmente, ambos están depositados en la base de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/plasmids/>) y hasta la fecha, pTF4.1 de 4104 pb (Acceso: X96982) y pTF5 de 19792 pb (Acceso: U73041), son los únicos plásmidos de *A. ferrooxidans* con la secuencia completa y anotada. En pTF4.1 se han encontrado dos CDS, MobC y relajasa, ambas son proteínas de movilización del plásmido (Pramila et al., 2016). En pTF5 se han determinado 13 CDS, de las cuales 4 corresponden a proteínas de oxidorreducción, ferredoxina [3Fe+S,4Fe-QS], proteína de la familia de reguladores FNR, proteína *prismane-like* y la subunidad NADH oxidoreductasa de una metano monooxigenasa, que probablemente representan un sistema de transporte de electrones de función desconocida (Dominy et al., 1997). Los otros CDS de este plásmido han sido identificados como probable recombinasa (2 CDS), proteína de segregación de plásmido, proteína de replicación, probable transposasa, resolvasa, proteína de estabilidad de plásmido y proteínas hipotéticas (Dominy et al., 1996).

En este estudio, el análisis de la secuencia completa del plásmido pAfPQ506-1 de la cepa *A. ferrooxidans* PQ506 ha generado conocimientos acerca de los genes putativos que porta y la función que cumplen (asignada por

herramientas bioinformáticas). Así, se ha encontrado en dicho plásmido 18 CDS, incluyendo proteínas de replicación, movilización y, por primera vez, el hallazgo de un operón *ars* en plásmido de *A. ferrooxidans*. Los CDS se explican en la Tabla 9 y sus funciones asignadas se discuten a continuación:

### © Operón *arsADCRB*

La mayoría de las bacterias contienen uno o más plásmidos, muchos de los cuales portan genes de resistencia a metales, pero no se ha demostrado que algún plásmido de *A. ferrooxidans* confiera resistencia a metales, los genes asociados a este tipo de resistencia se han hallado principalmente en el cromosoma de esta bacteria. Más bien, se han encontrado genes de resistencia a metales (arsénico, cadmio y zinc) en plásmidos de bacterias acidofílicas heterótrofas de los géneros *Acidiphilium* y *Acidocella* (Banerjee, 2004). Hasta la fecha tampoco hay publicaciones de plásmidos de esta especie con genes de resistencia a arsénico, por lo que el estudio actual constituye el primer reporte de un operón de resistencia a arsénico (operón *ars*) en un plásmido de *A. ferrooxidans*.

### ***arsA***

La proteína transmembrana ArsA es una ATPasa que interactúa con el transportador ArsB para formar una bomba de eflujo de arsenito energizada por la hidrólisis de ATP (Yang et al., 2012; Wang et al., 2004). Además de su interacción con ArsB, se ha propuesto que la ATPasa ArsA se asocia con diferentes proteínas de membrana para formar transportadores esenciales de arsenito (Ben Fekih, 2018; Castillo y Saier, 2010).

La actividad de ATPasa de ArsA está acoplada al eflujo de oxianiones de arsenito, antimonito y arsenato mediante la siguiente reacción:

arsenito (intracelular) + ATP + H<sub>2</sub>O  $\rightleftharpoons$  ADP + arsenito (extracelular) + H<sup>+</sup> + fosfato (The UniProt Consortium, 2019).

De acuerdo con los datos de UNIPROT (<https://www.uniprot.org>), la presencia de ArsA ha sido demostrada experimentalmente a nivel de proteína o de transcripto (ver el concepto en 4.3.3) en el plásmido R773 de *E. coli*, plásmido pNRC100 de *Halobacterium salinarum* (arquea) y genoma de *Methanothermobacter thermautotrophicus* (arquea). Ha sido inferida por homología (ver el concepto en 4.3.3) en el plásmido IncN R46 de *E. coli*, plásmido pKW301 de *Acidiphilium multivorum*, plásmidos pTcM1 y pLAtc3 de *Acidithiobacillus caldus*, genomas de *Aquifex aeolicus*, *Chlorobaculum tepidum*, *A. ferrivorans* y *A. ferrooxidans*.

Rosen (1990), demostró en el plásmido R773 de *E. coli* que la ATPasa que translocaba aniones era producto del operón de resistencia a arsénico del plásmido y que expulsaba oxianiones de arsenito, antimonito y arsenato, manteniendo baja la concentración intracelular de los oxianiones lo que generaba resistencia a estos agentes tóxicos.

ArsA codificada en el plásmido R773 de *E. coli* tiene dos mitades homólogas, el dominio A1 N-terminal (residuos 1–288) y el dominio A2 C-terminal (residuos 314–583), que están conectadas por un péptido de unión flexible de 25 aminoácidos (residuos 289–313). Cada mitad tiene un dominio de unión a nucleótidos (NBD) consenso. En la interface de los dos dominios hay un sitio de unión para As (III) o Sb (III), el dominio de unión a metaloide (MBD) involucrado en la activación de la actividad ATPasa. Conectando el MBD a los dos NBD están los dominios de transducción de señales (STDs) en cada mitad de ArsA (Yang et al., 2012).

El producto del gen *arsA* predicho en el plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans* PQ506 es una proteína de 595 aminoácidos ubicada río arriba adyacente a *arsD*. El tamaño de ArsD en pAfPQ506-1 está en el rango de tamaño de las proteínas homólogas de las especies *A. ferrivorans*, *A. ferrooxidans* y *A. caldus*, que es de 390 a 612 aminoácidos, de acuerdo con la base de datos UNIPROT (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=arsA+acidithiobacillus&sort=score>).



### ***arsD***

ArsD es una proteína represora débil independiente de inductor, del operón *ars*, pero su función primaria está relacionada a su capacidad de unirse al arsenito citosólico y transferirlo a la ATPasa ArsA antes de su expulsión por la bomba ArsB (Lin et al., 2006; Yang et al., 2012). ArsD es la primera metalochaperona descrita (Ben Fekih, 2018).

De acuerdo con los datos de UNIPROT (<https://www.uniprot.org>), la presencia de ArsD ha sido demostrada experimentalmente a nivel de proteína o de transcripto en el plásmido R773 de *E. coli* y en el plásmido pNRC100 de *Halobacterium salinarum* (arquea). Ha sido predicha (ver el concepto en 4.3.3) en el plásmido IncN R46 de *E. coli*, gran variedad de bacterias entre ellas *A. ferrivorans*, *A. ferrooxidans* y *A. caldus*.

Se conoce que la proteína ArsR funciona como represora del operón *ars*, pero también se ha demostrado que ArsD codificada en el plásmido R773 de *E. coli* es una proteína represora que actúa en *trans*, y que mientras ArsR controla el nivel basal del operón, ArsD controla la expresión máxima. Cuando los niveles de transcripto de *ars* se elevan, la síntesis de ArsB llega a ser tóxica, limitando el crecimiento. ArsD es un segundo regulador que controla el nivel superior de expresión del operón, evitando la sobreexpresión de ArsB. Así, la acción de los dos represores forma un circuito regulatorio homeostático que mantiene el nivel de expresión de *ars* dentro de un rango estrecho. Ambos son homodímeros de 13 kDa pero no tienen similitud de secuencias. Las proteínas regulatorias duales en un operón único son raras; en los sistemas metalorregulatorios sólo se ha reportado el par MerR/MerD (Chen y Rossen, 1997).

El producto del gen *arsD* puede controlar la expresión de genes fuera de este *cluster* de genes (Wang et al., 2004).

El gen *arsD* del plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans* PQ506 genera un producto que es una proteína pequeña de 120 aminoácidos y está ubicada río abajo adyacente a *arsA*. Ambas se transcriben en el mismo

sentido. Esto concuerda con la mayoría de operones *ars* de 5 genes, en los que *arsD* y *arsA* están siempre juntos porque ArsD incrementa la afinidad de ArsA por el As(III) haciendo que la bomba ArsAB sea más efectiva a las concentraciones de As(III) encontradas comúnmente en el ambiente (Yang et al., 2012). Asimismo, el tamaño de la proteína ArsD predicha en el plásmido pAfPQ506-1 es similar al tamaño de las proteínas homólogas de las especies *A. ferrivorans* y *A. ferrooxidans* que es de 120 aminoácidos también y de *A. caldus*, que es de 121 aminoácidos, de acuerdo con la base de datos UNIPROT (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=ArsD+Acidithiobacillus&sort=score>).

### ***arsC***

ArsC es una enzima citoplasmática denominada arsenato reductasa porque cataliza la reducción de arsenato [As(V)] a arsenito [As(III)] intracelularmente, antes de la expulsión de este último oxianión por la bomba ArsB. Las enzimas ArsC pertenecen a dos familias no relacionadas: la familia de la enzima del plásmido R773 de *E. coli* que usa glutatión y glutarredoxina como fuentes de electrones, y la familia de la enzima del plásmido pI258 de *S. aureus* que usa tiorredoxina como fuente de electrones. Un caso notable es ArsC de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803, que tiene una secuencia similar a la enzima de pI258 pero que emplea glutatión y glutarredoxina como fuentes de electrones (Ben Fekih, 2018; Zhu et al., 2014; Li et al., 2003).

La actividad catalítica de *arsC* se resume en la siguiente ecuación:

Arsenato + glutarredoxina  $\rightleftharpoons$  arsenito + glutarredoxina disulfuro + H<sub>2</sub>O  
(Martin et al., 2001).

De acuerdo con los datos de UNIPROT (<https://www.uniprot.org>), la presencia de ArsC ha sido experimentalmente demostrada a nivel de

proteína y transcripto en el plásmido pl258 de *S. aureus*, plásmido R773 de *E. coli*, *B. subtilis* y *Corynebacterium glutamicum*. Ha sido inferida por homología en diversas especies bacterianas de *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Oceanobacillus*, *Geobacillus*, *Haemophilus*, *Shigella*, *Yersinia*, *Neisseria*, plásmidos pSYSM y pSYSX de *Synechocystis* (cianobacteria), *Acidiphilium* y *Acidithiobacillus* (*A. ferrooxidans*, *A. caldus*, *A. ferrivorans* y *A. ferridurans*).

ArsC *in vitro*, también tiene una baja actividad de fosfatasa con para-nitrofenilfosfato (pNPP) como sustrato (se le predice actividad de proteína tirosina fosfatasa). Esto ha sido experimentalmente demostrado en *S. aureus* (plásmido pl258), *B. subtilis* y en *Corynebacterium glutamicum* (Roos et al., 2006).

En *S. aureus*, esta enzima también se une a potasio el cual la estabiliza e incrementa su actividad específica. El sulfato también estimula su actividad y el arsenito la inhibe (Roos et al., 2006).

El gen *arsC* del plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans* PQ506 es de la familia de la enzima del plásmido pl258 de *S. aureus*. Esto se deduce de los resultados de Barreto et al. (2003), quienes analizaron la secuencia genómica disponible de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y encontraron, por similitud de secuencias, que ArsC era más cercana a la arsenato reductasa de *S. aureus* (que usa tiorredoxina) que a la de *E. coli* y otras bacterias gramnegativas (que usan glutatión y glutarredoxina). El gen *arsC* de pAfPQ506-1 tiene 75% de identidad a *arsC* de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Tabla 13).

### **arsR**

El producto del gen *arsR* es un represor miembro de la familia SmtB/ArsR de proteínas metalorreguladoras homodiméricas (Ben Fekih, 2018; Busenlehner et al., 2003), que controla la expresión del operón *ars*. Actúa *in trans* uniéndose a las regiones promotoras de los operones *ars*. La interacción de ArsR con arsenito disocia la proteína represora del DNA

permitiendo así la transcripción del operón (Ben Fekih, 2018). Se ha demostrado en *E. coli* que el represor codificado en el cromosoma tiene la capacidad de regular la expresión del operón *ars* plasmidial pR773 y que el represor codificado en el plásmido pR773 puede regular la expresión de *ars* cromosomal (Xu et al., 1996; Suzuki et al., 1998).

Algunos microorganismos tienen más de un gen *arsR*, por ejemplo, en *Pseudomonas putida* se ha demostrado experimentalmente la presencia de dos operones de resistencia a arsénico, ARS1 y ARS2, cada uno de los cuales tiene los genes reguladores transcripcionales (represores) *arsR1* y *arsR2*, respectivamente. Las proteínas ArsR se unen a arsenito, e *in vitro*, también se unen a antimonio y bismuto, pero no a arsenato (Fernández et al., 2016). También se ha encontrado dos genes *arsR* en la arquea *Halobacterium* sp. cepa NRC-1, *arsR1* y *arsR2*, correspondientes a dos operones: *arsADRC* y *arsR<sub>2</sub>M* (Wang et al., 2004).

Butcher y Rawlings (2002), afirman que *arsR* del cromosoma de *A. ferrooxidans* es atípica (diferente a las *arsR* bien estudiadas de los plásmidos de *E. coli* y *S. aureus*) porque su secuencia de aminoácidos no está conservada en las regiones responsables de la unión a arsénico y que más bien está relacionada a un grupo de *arsR* cromosomales encontradas durante los proyectos de secuenciamiento de genoma, similares a la proteína reguladora SmtB de la cianobacteria *Synechococcus*.

De acuerdo con los datos de UNIPROT (<https://www.uniprot.org>), se tiene evidencia experimental a nivel de proteína o de transcripto en *Pseudomonas putida*, plásmido pNRC100 de *Halobacterium salinarum* (arquea) y *B. subtilis*. Ha sido inferida por homología (ver el concepto en 4.3.3) en *Marinobacter* y plásmido pSinA de *Sinorhizobium*. Ha sido y predicha en plásmidos R773 y IncN R46 de *E. coli*, plásmido pl258 de *S. aureus*, plásmido pSX267 de *Staphylococcus xylosus*, plásmido NT26\_p1 de *Rhizobium*, plásmido pJARS35 de *Yersinia pestis*, plásmido pM7012 de *Burkholderia*, y diversas especies bacterianas entre ellas *Campylobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Salmonella*

*enterica*, *Alcanivorax*, *Streptomyces*, *Methallosphaera*, *Psychrobacter*, *Shewanella benthica*, *Rhodoferax antarcticus*, *Achromobacter arsenitoxydans*, *Leptospirillum ferriphilum*, *Sulfurospirillum*, *A. ferrooxidans*, *A. ferrivorans*, plásmido pTcM1 de *A. caldus* y metagenoma de drenaje de mina.

El plásmido pAfPQ506-1 de la cepa *A. ferrooxidans* PQ506 presenta el operón de resistencia a arsénico con la configuración  $\overleftrightarrow{\text{arsADCRB}}$ , surgiendo la interrogante sobre si el represor ArsR podía regular a la bomba de eflujo de arsenito ArsB debido a que ambos se transcriben en direcciones divergentes. Al respecto, esto se ha investigado en cuatro cepas de *A. ferrooxidans* (ATCC 33020, 23270, 19859 y 13598) que portaban en su cromosoma el operón con la configuración  $\overleftrightarrow{\text{arsCRBH}}$ , en el que se ha demostrado experimentalmente que *arsR* regulaba la expresión (represión) de ambos módulos (*arsCR* y *arsBH*) y que tanto el arsenito como el arsenato inducían su expresión (Butcher y Rawlings, 2002; Butcher et al., 2000). Posteriormente, se comprobó que el producto del gen *arsR* podía controlar la expresión de genes que están fuera de este *cluster* (Wang et al., 2004). Un hallazgo similar fue reportado en la arquea *Halobacterium* sp. cepa NRC-1, en la que la estructura del operón  $\overleftrightarrow{\text{arsADRC}}$  tenía genes que se transcribían de manera divergente y que era funcional. Los investigadores concluyeron que en dicha haloarquea operaban múltiples mecanismos de resistencia a arsénico (Wang et al., 2004).

### ***arsB***

El gen *arsB* codifica la bomba de arsenito que es un transportador específico que permite excretar arsenito (Silver y Phung, 2005). ArsB es una proteína integral de membrana capaz de expulsar arsenito y antimonito del citoplasma celular, disminuyendo así la acumulación de este metaloide (Yang et al., 2012). La proteína ArsB presenta 13 regiones transmembrana putativas y actúa como un canal asociado a la membrana

celular, junto a otra bomba proteica con actividad de ATPasa denominada ArsA (Tisa y Rosen, 1990).

La toxicidad de los metaloides arsénico y antimonio se debe a su captación, mientras que la detoxificación requiere de eflujo. La captación de las formas inorgánicas trivalentes de arsénico y antimonio en *Escherichia coli* es facilitada por el canal de la acuagliceroporina GlpF y el eflujo de éstos es catalizado por ArsB que es un antiporter de metaloide-proton (Meng et al., 2004). ArsB tiene un modo dual de acoplamiento de energía: por hidrólisis de ATP catalizada por ArsA, o por la fuerza protón motriz (Ben Fekih, 2018).

De acuerdo con los datos de UNIPROT (<https://www.uniprot.org>), la proteína ArsB ha sido evidenciada experimentalmente a nivel de proteína y de transcripto en *E. coli* y *B. subtilis*, e inferida por homología en *S. aureus*, plásmido pI258 de *S. aureus*, *S. epidermidis*, plásmidos de *Lactobacillus* y *Pediococcus*, plásmido pSX267 de *S. xylosus*, *Escherichia coli* O157:H7, *S. flexneri*, plásmidos pYV y pYVe227 de *Y. enterocolitica*, plásmidos incHI2 y pSTm-A54650 de *Salmonella typhimurium* y diversos genomas y plásmidos de enterobacteriáceas, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bordetella*, *Halomonas*, *Herminiimonas arsenicoxydans*, *Thiomonas arsenitoxydans*, *Thioalkalivibrio nitratreducens*, *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus caldus*, *A. ferrivorans*, entre otras especies. Ha sido predicha (ver el concepto en 4.3.3) en plásmidos R773 e IncN R46 de *E. coli*, especies de *Acidithiobacillus* y de *Leptospirillum*.

El plásmido pAfPQ506-1 de la cepa *A. ferrooxidans* PQ506 presenta la secuencia codificante de ArsB localizada al final del operón: *arsADCRB*, que es diferente al orden de las secuencias en el operón *ars* canónico: *arsRBC* o *arsRDABC*. Asimismo, la orientación de la transcripción de *arsB* en el plásmido pAfPQ506-1 es opuesta a *arsR* (el gen regulador) y a los demás genes del operón, a diferencia de los operones canónicos en los que todos se transcriben en la misma orientación. Se ha hecho un análisis de la distribución de los genes de arsénico en procariotes, encontrando

que los más comunes son *arsRBC* or *arsRDABC*, pero que se ha hallado variantes en los transposones de algunas cepas como *Acidithiobacillus caldus* cepa f (*arsRCDADA ORF7 CBS arsB*) y *Leptospirillum ferriphilum* (*arsRCDA CBS arsB*) (Tuffin et al., 2005; Tuffin et al., 2006; Ben Fekih et al., 2018). La presencia de genes de resistencia al arsénico en plásmidos y transposones constituye una oportunidad para la diseminación, entre los microorganismos, de estas características genéticas adaptativas por transferencia horizontal de genes (Ben Fekih et al., 2018). Hay reportes de varias especies microbianas con operones *ars* de diferentes configuraciones, tanto en su cromosoma como en plásmido, incluyendo a *arsB* con orientación de la transcripción opuesta a *arsR*, y que aún así el operón confería resistencia al arsénico demostrado experimentalmente (Ben Fekih et al., 2018; Qin et al., 2006; Tuffin et al., 2006; Ryan y Colleran, 2002; Butcher and Rawlings, 2002; Butcher et al., 2000; Saltikov et al., 2003; Wang et al., 2004).

La actual disponibilidad de las secuencias genómicas completas de diversos procariotes ha incrementado la información sobre numerosos genes *ars* cromosomales con similaridad a aquellos identificados en plásmidos, demostrándose que estos genes están organizados en una diversidad de configuraciones en los distintos microorganismos. Ahora son comunes las variantes del operón canónico *arsRBC* en bacterias y arqueas de diferentes orígenes y es muy posible que cada especie procariótica tenga por lo menos un sistema de resistencia a arsénico (Ben Fekih et al., 2018).

### **Modelo del funcionamiento del operón *arsADCRB* predicho en el plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans* PQ506**

Sobre la base del análisis de homología de secuencias del plásmido pAfPQ506-1 se encontró un operón *arsADCRB* y teniendo en cuenta los hallazgos en las investigaciones sobre los operones *ars* en plásmidos y cromosomas de diferentes especies bacterianas, incluyendo



*Acidithiobacillus* spp., antes discutidos, se plantea el siguiente modelo de funcionamiento del operón (Fig. 19):

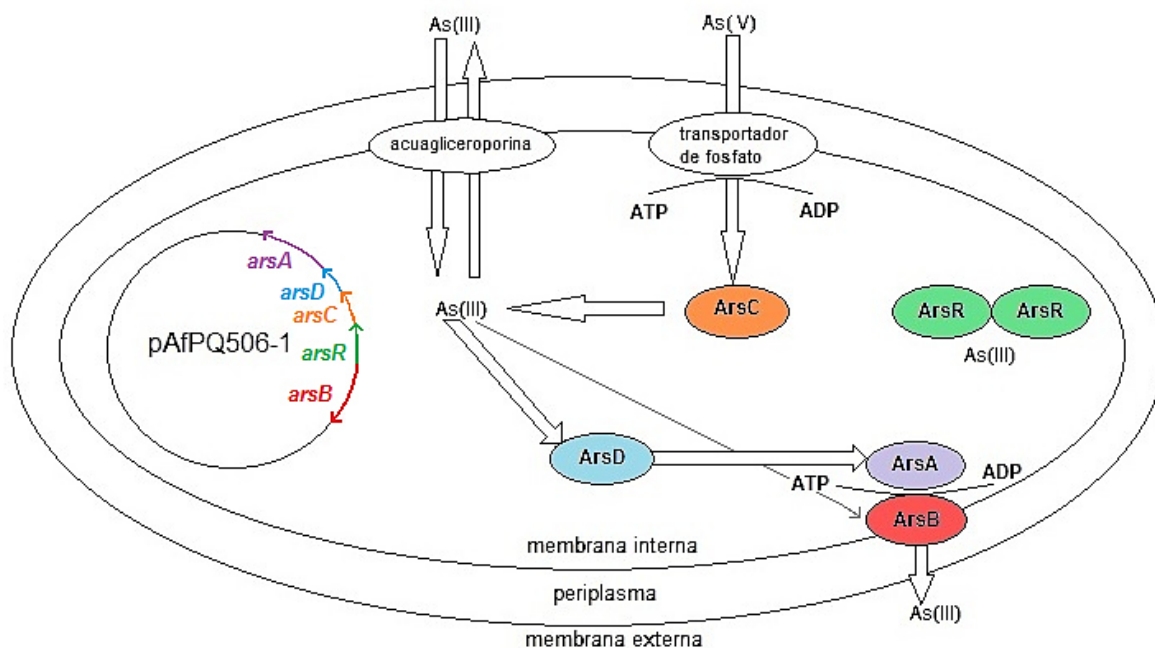


Figura 19. Modelo de detoxificación de arsénico del operón *arsADCRB* del plásmido pAfPQ506-1 de la cepa *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506.

En condiciones aeróbicas, As(V) ingresa a la célula a través de un sistema transportador de fosfato (por ser similar a éste) y es reducido a As(III) por la arsenato reductasa ArsC. As(III) ingresa a la célula a través de las acuagliceroporinas (como GlpF de *E. coli*). As(III) se une a la metalochaperona ArsD que lo traslada a la subunidad ArsA (que tiene actividad de ATPasa) de la bomba de eflujo de As(III) ArsAB. ArsB es la subunidad transportadora. También As(III) puede ser expulsado directamente por ArsB usando la energía de la fuerza protón motriz. ArsR es un homodímero represor del operón que se une al promotor de éste y que cuando interactúa con As(III) se disocia del DNA permitiendo la transcripción del operón.

## ● Proteína MobA

Esta proteína predicha en el plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans* PQ506, también se ha predicho en el plásmido pAfPQ510-2 de *A. ferrivorans* PQ510 y se ha discutido en 6.1.

MobA predicha en el plásmido pAfPQ506-1 tiene 89.94% de identidad y un Evalúe de 0 a una proteína de la familia MobA/MobL de *Acidithiobacillus ferrivorans* (Acceso: WP\_087454967.1) y es similar a un gen ortólogo con producto protéico de la misma familia de *Acidithiobacillus thiooxidans* (Tabla 9).

### © Proteína de replicación

Esta proteína predicha en el plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans* PQ506 tiene un 82.6% de identidad y un Evalue 4.00E-119 a una proteína de replicación de *Acidithiobacillus thiooxidans* (Acceso A0A1C2HWF7) (Tabla 9). Asimismo, es 84.5% idéntica a una proteína con dominio hélice-vuelta-hélice de una bacteria del orden Burkholderiales (Acceso A0A257QHN9) (<https://www.uniprot.org>).

El dominio hélice-vuelta-hélice (HTH, *helix-turn-helix*) es un común denominador en los factores de transcripción basales y específicos de los tres dominios de la vida (Aravind et al., 2005).

Las proteínas que tienen este dominio son reguladoras transcripcionales de unión a DNA, reguladoras de respuesta del sistema de dos componentes y proteínas de iniciación de replicación, en todas las especies de procariotes y algunas de eucariotes. Gracias al estudio de estas proteínas por más de tres décadas y a la información dada por el análisis masivo de secuencias, se ha ampliado el conocimiento sobre sus funciones como, reparación de DNA, metabolismo de RNA e interacciones proteína-proteína en diversos contextos de señalización, también el dominio HTH está en enzimas y en factores sigma (Aravind et al., 2005). Más recientemente se ha encontrado que varias antitoxinas del sistema Toxina-Antitoxina tipo II son proteínas HTH (Wen et al., 2014). En *Acidithiobacillus ferrooxidans*, se ha reportado varias antitoxinas que tienen el dominio HTH (Bustamante et al., 2014), también en cianobacterias (Kopfmann et al., 2016).

### © Proteína putativa óxidoreductasa disulfuro-piridin nucleótido dependiente de FAD

Las disulfuro óxidoreductasas dependientes de FAD encontradas en *Acidithiobacillus* spp. son importantes en la homeostasis redox de la célula. Tienen actividad de transferencia de electrones, catalizando una reacción

óxido reducción en la cual un grupo que contiene azufre actúa como donador de electrones o hidrógeno para reducir NAD o NADP (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=FAD-dependent%20pyridine%20nucleotide%20AND%20organism:%22Acidithiobacillus%22&sort=score>).

En bacterias fotolitoautótrofas y quimiolitoautótrofas que usan sulfuros como fuente de hidrógeno, la enzima, cuyo nombre corto es sulfuro quinona reductasa (SQR), es crítica en el paso inicial de oxidación del sulfuro. SQR es miembro de la familia de óxidoreductasas dinucleótido de piridina que contienen disulfuro. Ejemplos de este tipo de enzimas son glutatión reductasa, tioredoxina reductasa, ión mercúrico reductasa y lipoamida dehidrogenasa, y todas ellas translocan electrones de NADPH a través de FAD a un sitio activo disulfuro/ditiol (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR015904>).

Vale la pena señalar que, en estudios recientes, se coloca al producto del gen *arsH* de *Acidithiobacillus thiooxidans* A01, ubicada lejos de otros genes *ars*, en la familia de las reductasas flavin mononucleótido dependiente de NADPH, la cual podría producir peróxido de hidrógeno, facilitando la conversión de arsenato a arsenito (Butcher et al., 2000; Ye et al., 2007; Vorontsov et al., 2007; Jiang et al., 2015). Algunos investigadores han reportado que la proteína ArsH de *A. ferrooxidans* tiene una actividad de reductasa férrica alta cumpliendo una importante función en la asimilación de ión férrico citosólico *in vivo* (Mo et al., 2011; Jiang et al., 2015).

Esta disulfuro óxidoreductasa dependiente de FAD predicha en el plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans* PQ506 tiene un 91.3% de identidad y un Evalúe 0 a una proteína del mismo nombre de metagenoma de drenaje de minas (Tabla 9). También se encuentra en diversas especies bacterianas incluyendo *Acidithiobacillus*. Al hacer BlastN en la base de datos NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) resulta en 82% de identidad y Evalúe 0 a secuencias de *Acidithiobacillus caldus* (en cromosoma, plásmido y Tn) y de *Sulfuriferula*; 81% identidad y Evalúe 0 a una secuencia de *Thiomonas*. Estas secuencias son denominadas como proteína similar

a NADH oxidasa en *Acidithiobacillus*, CoA disulfuro reductasa en *Sulfuriferula* y disulfuro óxidoreductasa piridin nucleótido dependiente de FAD en *Thiomonas*. En todos los casos estas enzimas son disulfuro oxidoreductasas dependientes de FAD. Al hacer BlastP en la base de datos UNIPROT (<https://www.uniprot.org/blast/>), resulta en 83% de identidad y Evalúe 0 a la secuencia aminoacídica de CoA disulfuro reductasa de *Sulfuriferula*; 82% de identidad y Evalúe 0 a disulfuro óxidoreductasa piridin nucleótido dependiente de FAD de *Pseudomonas xanthomarina*, CoA disulfuro reductasa de *Pseudomonas hunanensis*, proteína similar a NADH oxidasa de *Acidithiobacillus caldus*; y 81% de identidad y Evalúe 0 a la disulfuro óxidoreductasa piridin nucleótido dependiente de FAD de *Thiomonas delicata*.

La secuencia codificante de las disulfuro oxidoreductasas dependientes de FAD están localizadas cerca al operón *ars* del cromosoma, plásmido y transposón de *Acidithiobacillus caldus*, lo que también ocurre en el plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans*. Es probable que esta enzima esté cumpliendo una función de reductasa de arsenato, puesto que, como se ha discutido en párrafos anteriores, enzimas similares son reductasas de iones.

### ● **Proteína hipotética con dominio CBS**

El dominio cistationina-beta-sintasa (CBS) es evolutivamente conservado y está presente en arqueas, bacterias y eucariotes. Este dominio generalmente está repetido en tandem en proteínas citosólicas y de membrana que realizan diferentes funciones (enzimas metabólicas, kinasas y canales). Los estudios cristalográficos de dominios CBS bacterianos han mostrado que dos dominios forman una estructura dimérica intramolecular (par CBS). Se ha demostrado que los dominios CBS pueden unirse a ligandos que contienen adenosina como ATP, AMP, o S-adenosilmetionina, por lo que se ha hipotetizado que los dominios CBS funcionan como sensores de metabolitos intracelulares (Ignoul y Eggermont, 2005). También se puede unir a NAD y diadenosina polifosfatos (Baykov et al., 2011).

Según la base de datos UNIPROT (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=CBS+domain+Acidithiobacillus&sort=score>), en *Acidithiobacillus* se han encontrado proteínas con dominio CBS principalmente con funciones asignadas de inosina-5'-monofosfato dehidrogenasa, proteína de unión a ATP del transportador ABC glicina/betaina, proteína CorC de eflujo de Mg y Co, transportador de Co, proteína de la familia canal-Cl activada por voltaje y azúcar isomearasa de la familia KpsF/GutQ. También hay numerosos reportes sin función asignada.

La secuencia codificante de la proteína hipotética con dominio CBS predicha en el plásmido pAfPQ506-1 se encuentra localizada cerca al operón *ars*, al igual que en los transposones TnAtcArs y TnLfArs de *A. caldus* y *L. ferriphilum*, respectivamente (Figs. 10 y 20). Es posible que esta proteína esté implicada en el transporte o eflujo del arsénico.

Esta proteína hipotética con dominio CBS predicha en el plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans* PQ506 tiene un 59.65% de identidad y un Evalúe 7.00E-41 a una proteína del mismo nombre de *Thiomonas* (Tabla 9).

## © Proteínas hipotéticas DUF (dominio de función desconocida)

### DUF2442

Según la base de datos UNIPROT, son proteínas de bacterias y hongos que han sido anotadas como de probable función de *molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein A*, lo cual no ha sido verificado por lo que es de función desconocida. Una proteína de unión a DNA similar a un represor Lambda de *Nitrosomonas europaea*, está relacionada con esta superfamilia.

Por otro lado, varias proteínas DUF han sido identificadas como toxinas o antitoxinas en *Acidithiobacillus ferrooxidans* por Bustamante et al. (2014), quienes señalan que todos los sistemas TA encontrados estaban cerca a elementos genéticos móviles, por lo que podrían estar involucrados en el

mantenimiento de ellos. Considerando esta observación, en el plásmido pAfPQ506-1 (Fig. 10), esta proteína (DUF2442) y la siguiente (DUF4160), podrían estar conformando un nuevo operón Toxina-Antitoxina, porque están cerca entre sí y son de tamaño pequeño: 84 y 77 aminoácidos. Por supuesto, esto tendría que ser demostrado experimentalmente.

### **DUF4160**

Según la base de datos UNIPROT y en Pfam Accession: PF13711, estas proteínas se han encontrado en gran diversidad de bacterias incluyendo *A. ferrooxidans* y *A. ferrivorans*, pero en ningún caso se le ha asignado función.

Tomando en cuenta que varias proteínas DUF han sido identificadas como toxinas o antitoxinas en *Acidithiobacillus ferrooxidans* por Bustamante et al. (2014), esta proteína podría ser una de ellas, lo cual ha sido discutido anteriormente.

### **© Otras proteínas hipotéticas**

El plásmido pAfPQ506-1 porta otras secuencias codificantes de proteínas hipotéticas a las que no se ha identificado algún dominio previamente reportado. La mayoría presentan alta identidad a proteínas desconocidas de especies de *Acidithiobacillus* (Tabla 9). Probablemente son específicas de la replicación y mantenimiento del plásmido, sumado al escaso conocimiento sobre las funciones de las secuencias codificantes de plásmidos y otros elementos genéticos móviles, así como del cromosoma de las bacterias que habitan en ambientes de drenaje ácido de minas. Peng et al. (2017) señalan que solamente una pequeña fracción de las secuencias de plásmidos y de fagos de estas bacterias, han sido depositadas en las bases de datos. Lo mismo puede ocurrir con las secuencias cromosomales.

### 6.2.1 Análisis genómico comparativo de los genes de resistencia al arsénico *ars*

El plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans* PQ506, presentó un operón *ars* de resistencia a arsénico, con la configuración  $\overleftrightarrow{\text{arsADCRB}}$  (Fig. 10 y 11). Este se comparó con los operones *ars* de 18 plásmidos anotados en el servidor RAST, aislados de bacterias de distintas procedencias (Fig. 12), encontrando que los operones tenían variadas configuraciones. No hay reportes de otros plásmidos que porten genes de resistencia a arsénico en aislados de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, por lo que este hallazgo es el primero. Más bien, sí se han encontrado transposones insertados en el cromosoma, que codifican operones *ars* que confieren alto nivel de resistencia al arsénico a su hospedero bacteriano, en comparación con los operones *ars* cromosomales (Rawlings 2008). Estos son los transposones Tn*AtcArs* de *A. caldus* y Tn*LfArs* de *Leptospirillum ferriphilum*, que tienen una configuración similar a nuestro plásmido, pero en sentido inverso (Fig. 20), y que incrementan la resistencia a arsénico de 20 mMol (con genes *ars* cromosomales sin transposón) a más de 50 mMol de arsenito (con Tn*AtcArs* además de los genes cromosomales); no se probó a mayores concentraciones porque es difícil mantenerlo en solución (Rawlings 2008). También se ensayó en mutantes de *E. coli* con genes *ars* cromosomales clonados, resistiendo el arsenito a 0.25 mMol, en tanto que cuando se le transfirió Tn*AtcArs*, la resistencia al arsenito se incrementó a por lo menos 5 mMol (Rawlings 2008).



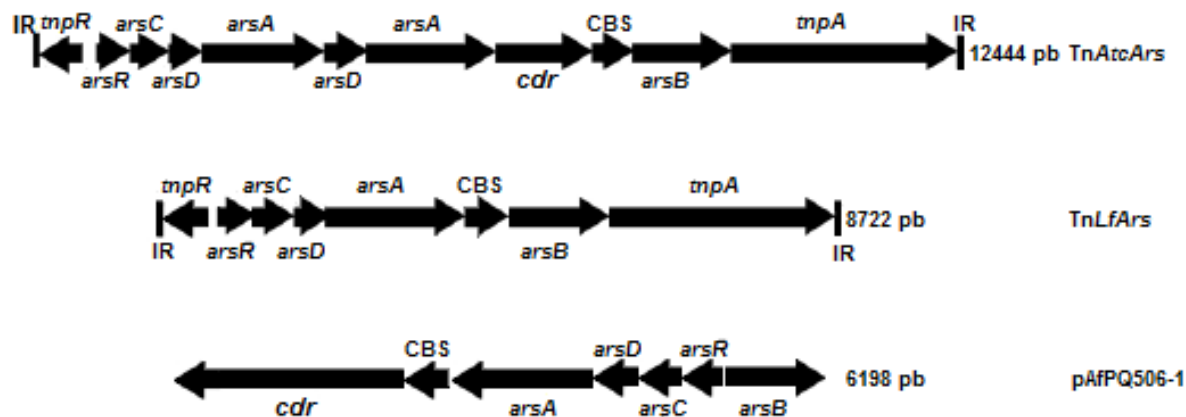


Fig. 20. Comparación de la configuración de los operones *ars* codificados en los transposones TnAtcArs de *Acidithiobacillus caldus* y TnLfArs de *Leptospirillum ferriphilum* y el operón *ars* portado en el plásmido pAfPQ506-1 de *Acidithiobacillus ferrooxidans* predicho en este estudio (adaptado de Rawlings 2008). Las flechas representan las secuencias codificantes y la orientación de la transcripción.

En cuanto a la configuración del operón *ars* en otros plásmidos y en el cromosoma de diversas bacterias es variada, pero hay dos formas comunes, la de 3 genes (*arsRBC*) o la de 5 genes (*arsRDABC*) (Butcher y Rawlings, 2002). Sin embargo, en el cromosoma de cuatro cepas de *A. ferrooxidans* se ha encontrado un operón *ars* con la siguiente configuración inusual y divergente:  $\overleftarrow{ars} \overrightarrow{CRBH}$ , que confiere resistencia al arsenito, arsenato y antimonio demostrado experimentalmente (Butcher et al., 2000; Butcher y Rawlings, 2002), por lo que una configuración diferente no implica menor eficiencia. Posteriormente, se han ido dilucidando las configuraciones de operones *ars* en mayor número de plásmidos y cromosomas bacterianos debido al incremento de los genomas disponibles de procariotes resistentes al arsénico, encontrando heterogeneidad en los operones o *clusters* tanto en su contenido genético como en su organización, aún en especies cercanamente relacionadas (Ben Fekih et al., 2018; Andres y Bertin, 2016; Kalia y Joshi, 2009).

Comparando cada uno de los genes del operón *ars* del plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans* PQ506 con sus homólogos en plásmidos y cromosomas de diversas bacterias, se encontró que el gen *arsB* mostró mayor identidad (94%) a los genes cromosomales del

mismo nombre de cinco cepas de *Acidithiobacillus ferrivorans*, incluyendo a *A. ferrivorans* PQ33 que fue aislada del mismo hábitat que *A. ferrooxidans* PQ506. También tiene 94% de identidad al gen cromosomal *arsB* de *A. ferrooxidans* BY0502, 90% al de *A. caldus* MTH-04, 87% al de dos cepas de *A. ferrooxidans*, 83% al de dos cepas de *A. caldus*, 82% al de la cepa *A. ferrooxidans* ATCC23270 y en menor medida al gen *arsB* cromosomal de otras especies, como *Acidihalobacter* y *Aurantimonas* (79 a 70%), entre otras bacterias (Tabla 11). La identidad más alta encontrada entre *arsB* del plásmido pAfPQ506-1 y *arsB* de otros plásmidos es de 70% con el plásmido pACMV2 de *Acidiphilium multivorum*, seguido de pCNB de *Comamonas testosteroni* CNB-1 (65%), pUNNAMED3 de *Cupriavidus metallidurans* Ni-2 (65%) y otros (62 a 60%); los plásmidos pLAtc3 y pTcM1 de *Acidithiobacillus caldus* no portan el gen *arsB* (Tabla 10).

El gen *arsR* del plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans* PQ506 mostró mayor identidad a los genes *arsR* cromosomales de las especies de *Acidithiobacillus*, como 87% al de *A. ferrooxidans* BY0502, 82% al de *A. ferrivorans* YL15, de 74 a 62% a *arsR* de otras especies de este género incluyendo a *A. ferrivorans* PQ33 (62%), y menor identidad (57 a 28%) a *arsR* cromosomales de otras especies (Tabla 11). La identidad más alta encontrada entre *arsR* del plásmido pAfPQ506-1 y *arsR* de otros plásmidos es de 53 y 52% con los plásmidos de *Acidithiobacillus caldus* pLAtc3 y pTcM1, respectivamente, seguido de 51% con el gen *arsR* de pRALTA de *Cupriavidus taiwanensis*, 50% con el de pR485 de *Morganella morganii* y entre 48 y 32% con *arsR* de plásmidos de otras especies (Tabla 10).

El gen *arsC* del plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans* PQ506 mostró mayor identidad a los genes *arsC* cromosomales de cepas de *A. ferrivorans* con un 91%, *A. ferrooxidans* BY0502 con 85%, cepas de *A. caldus* con 78-77% y otras cepas de *A. ferrooxidans* con 75% de identidad (Tabla 11). El gen *arsC* de otras cepas como *Sulfuriferula* sp. AH1 y *Methylobacillus flagellatus* KT tuvieron una identidad importante de 71 y 70%, respectivamente (Tabla 11). La identidad con *arsC* de

otras especies fluctuó entre 69 a 30% (Tabla 11). La identidad más alta encontrada entre *arsC* del plásmido pAfPQ506-1 y *arsC* de otros plásmidos es de 71% con los plásmidos de *Acidithiobacillus caldus* pLAtc3 y pTcM1, respectivamente, seguido de 66% con pAZKH de *Azoarcus* sp. KH32C, 65% con pUNNAMED3 de *Cupriavidus metallidurans* Ni-2, 50% con pR773 de *E. coli*, y entre 44 y 32% con *arsC* de plásmidos de otras especies (Tabla 10).

El gen *arsD* del plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans* PQ506 mostró mayor identidad a los genes *arsD* cromosomales de cepas de *A. ferrivorans* con 95% y *A. ferrooxidans* BY0502 con 92%, y entre 62 y 39% de identidad con *arsA* de otras especies bacterianas (Tabla 11). La identidad más alta encontrada entre *arsD* del plásmido pAfPQ506-1 y *arsD* de otros plásmidos es de 65% con los plásmidos de *Acidithiobacillus caldus* pLAtc3 y pTcM1, seguido de 61% con pAZKH de *Azoarcus* sp. KH32C, y entre 55 y 47% con *arsD* de plásmidos de otras especies (Tabla 10).

El gen *arsA* del plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans* PQ506 mostró mayor identidad a los genes *arsA* cromosomales de cepas de *A. ferrivorans* con 93%, *A. ferrooxidans* BY0502 con 91%, y *Sulfuriferula* sp. AH1 con 86% de identidad, seguido de *Methylobacillus flagellatus* KT con 71%, *Klebsiella michiganensis* 3T412C con 70% y *Azoarcus* sp. también con 70% de identidad, y entre 69 y 46% de identidad con *arsA* de otras especies bacterianas (Tabla 11). Asimismo, la identidad entre *arsA* de pAfPQ506-1 y *arsA* de otros plásmidos fue mayor con los plásmidos pLAtc3 y pTcM1 de *A. caldus* con 86%, seguido de pR773 de *E. coli* con 77% y pAZKH de *Azoarcus* sp. KH32C con 72% de identidad, y entre 70 y 51% de identidad con *arsA* de plásmidos de otras especies (Tabla 10).

### 6.2.2 Análisis filogenético de plásmidos de bacterias ambientales con énfasis en las procedentes de ambientes mineros

El alineamiento de las secuencias completas de 63 plásmidos de bacterias aisladas de ambientes mineros, suelos, lagunas, océanos y algunas de origen clínico, generó un árbol Neighbor Joining de distancias genéticas (Fig. 13) que muestra una mayor cercanía del plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans* con pAfPQ33-1 de *A. ferrivorans*, y luego con pAfPQ510-1 y pAfPQ510-2 de *A. ferrivorans*, formando un clado. El plásmido pAfPQ33-2 está en otro clado junto con AFERRlp, ambos de *A. ferrivorans*. El plásmido pAfPQ510-3 de *A. ferrivorans* se muestra solo en otro clado. Todos los plásmidos mencionados, excepto AFERRlp, son portados por cepas aisladas del mismo hábitat, en una zona minera de Cerro de Pasco, lo que significa que hay secuencias comunes entre los plásmidos, sugiriendo eventos de recombinación y transferencia horizontal de genes entre ellos que facilite la adaptación a su tipo de ambiente. Asimismo, el análisis comparativo de las secuencias completas de los 63 plásmidos muestra que los plásmidos de las mismas especies bacterianas forman grupos entre sí, preferentemente, lo que sugiere la adaptación de los plásmidos a sus respectivos hospederos. No hay publicaciones sobre análisis comparativo y filogenético basado en las secuencias completas de plásmidos de bacterias ambientales, sólo hay algunas sobre plásmidos de especies de importancia clínica (Johnson et al., 2011; Petersen, 2011; Nithya et al., 2017; Knudsen et al., 2018; Worley et al., 2018).

El análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas (Figura 14) y aminoacídicas (Figura 15) de ArsC (arsenato reductasa) extraídas de 18 plásmidos, generó árboles que muestran que el gen *arsC* del plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans* se ubica en un clado junto con *arsC* de los plásmidos de las especies bacterianas *Azoarcus* sp., *C. metallidurans* y *A. caldus* que habitan en ambientes extremos con metales pesados, revelando similaridad genética entre ellos, probablemente por intercambio de secuencias que favorecen su

adaptación a las condiciones ambientales. Asimismo, el análisis filogenético muestra que los genes *arsC* forman 4 clados, implicando una significativa divergencia entre sus secuencias. Jackson y Dugas (2003) realizaron un análisis filogenético de los genes *arsC* de bacterias y arqueas, encontrando que los genes *arsC* portados en plásmidos no son monofiléticos, sugiriendo intercambios plásmido-cromosoma y transferencia horizontal de genes. Kaur et al. (2009) reportaron que el análisis filogenético de *arsC* indicaba que este gen era prevalente entre las cepas aisladas de *E. coli* ambientales y que había una divergencia significativa entre sus secuencias de DNA. Villegas-Torres et al. (2011) también realizaron un análisis filogenético de los genes *arsC* de bacterias aisladas de suelos poluídos con arsénico, encontrando transferencia horizontal de estos genes en los 16 morfotipos estudiados, posiblemente estimulada por el crecimiento exponencial de la polución ambiental.

## 7. CONCLUSIONES

7.1. Las cepas *Acidithiobacillus ferrooxidans* PQ506 y *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ510, aisladas del mismo hábitat de un ambiente minero de Cerro de Pasco - Perú, presentan uno y tres plásmidos denominados pAfPQ506-1 y pAfPQ510-1, pAfPQ510-2 y pAfPQ510-3, respectivamente, de los cuales se ha obtenido la secuencia completa y anotación funcional.

7.2. De la anotación funcional de los plásmidos pAfPQ510-1, pAfPQ510-2 y pAfPQ510-3, se predice que el primero porta 41 genes codificantes de proteínas, de las cuales 28 son hipotéticas y 13 con función asignada, el segundo porta 21 genes codificantes de proteínas, de las cuales 15 son hipotéticas y 6 con función asignada, y el tercero porta 15 genes codificantes de proteínas, de las cuales 10 son hipotéticas y 5 con función asignada. Las funciones de los plásmidos están asociadas a la respuesta al estrés ambiental y a la recombinación y movilización del plásmido.

7.3. De la anotación funcional del plásmido pAfPQ506-1 se predice que porta 16 genes codificantes de proteínas, de las cuales 8 son hipotéticas y 8 con función asignada. Las funciones están involucradas en la resistencia al arsénico y a la replicación y movilización del plásmido.

7.4. El hallazgo del operón  $\overleftarrow{\text{arsADCRB}}\overrightarrow{\hspace{0.5cm}}$  en pAfPQ506-1 es el primer reporte de genes de resistencia a arsénico en plásmidos de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

7.5. El operón  $\overleftarrow{\text{arsADCRB}}\overrightarrow{\hspace{0.5cm}}$  tiene un alto grado de identidad y una configuración similar a los genes *ars* del plásmido pLAtc3 de *Acidithiobacillus caldus*. Asimismo, es similar, pero en sentido inverso, a los genes *ars* del plásmido pTcM1 y del transposón TnAtcArs de *A. caldus*, y del transposón TnLfArs de *Leptospirillum ferriphilum*.

- 7.6. El plásmido pAfPQ506-1 es filogenéticamente más cercano al plásmido pAfPQ33-1, y luego a los plásmidos pAfPQ510-1 y pAfPQ510-2, formando un clado, lo que significa que hay secuencias comunes entre ellos.
- 7.7. El gen *arsC* del plásmido pAfPQ506-1 de *A. ferrooxidans* se agrupa junto con *arsC* de los plásmidos de *Azoarcus* sp., *C. metallidurans* y *A. caldus*, que habitan en ambientes extremos con metales pesados, formando un mismo clado.



## 8. RECOMENDACIONES

- 8.1. Diseñar ensayos experimentales para determinar la función de los plásmidos pAfPQ510-1, pAfPQ510-2 y pAfPQ510-3 de *A. ferrivorans*.
- 8.2. Realizar estudios postgenómicos de resistencia al arsénico con el plásmido pAfPQ506-1 ya que al tener su genoma secuenciado podemos usar herramientas genéticas y moleculares para demostrar experimentalmente la función de los genes del operón *arsADCRB* y para investigar si otros genes presentes en el plásmido influyen en la resistencia al arsénico.
- 8.3. Hacer investigaciones para caracterizar las funciones de replicación y movilización de los plásmidos estudiados.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ◆ ABANTO M., PARIONA N., CALDERON J., GUERRA G., RAMIREZ R., DELACRUZ-CALVO F. RAMIREZ P. (2013). Molecular identification of iron oxidizing bacteria isolated from acid mine drainages in Peru. *Advanced Materials Research* 825: 84-87. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.825.84
- ◆ ACUÑA L.G., CÁRDENAS J.P., COVARRUBIAS P.C., HARISTOY J.J., FLORES R., NUÑEZ H., RIADI G., SHMARYAHU A., VALDÉS J., DOPSON M., RAWLINGS D.E., BANFIELD J.F., HOLMES D.S., QUATRINI R. (2013). Architecture and gene repertoire of the flexible genome of the extreme acidophile *Acidithiobacillus caldus*. *PLoS One* 8(11): e78237. DOI: 10.1371/journal.pone.0078237
- ◆ AGARWAL S.; AGARWAL S.; BHATNAGAR R. (2007). Identification and characterization of a novel toxin–antitoxin module from *Bacillus anthracis*. *FEBS Letters* 581 (9): 1727–1734. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.03.051
- ◆ ALTSCHUL S.F.; GISH W.; MILLER W.; MYERS E.W.; LIPMAN D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403-410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- ◆ ANDRES J.; BERTIN P.N. (2016). The microbial genomics of arsenic. *FEMS Microbiology Reviews* 40 (2): 299-322. DOI: 10.1093/femsre/fuv050
- ◆ ANDREWS S. (2014). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- ◆ APARICIO T.; LORENZO P.; PERERA J. (2000). pT3.2I, the smallest plasmid of *Thiobacillus* T3.2. *Plasmid* 44(1): 1-11. DOI: 10.1006/plas.2000.1461
- ◆ ARAVIND L.; ANANTHARAMAN V.; BALAJI S.; BABU M. M.; IYER L. M. (2005). The many faces of the helix-turn-helix domain: Transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiology Reviews* 29 (2): 231–262. DOI: 10.1016/j.fmrre.2004.12.008
- ◆ ASTON J.E.; APEL W.A.; LEE B.D.; PEYTON B.M. (2010). Effects of cell condition, pH, and temperature on lead, zinc, and copper sorption to *Acidithiobacillus caldus* strain BC13. *Journal of Hazardous Materials* 184(1-3): 34-41. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.07.110

- ◆ AYANGBENRO A.; BABALOLA O. (2017). A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14(1): 94. DOI: 10.3390/ijerph14010094
  
- ◆ AZIZ RK; BARTELS D; BEST AA; DEJONGH M; DISZ T; EDWARDS RA; FORMSMA K; GERDES S; GLASS EM; KUBAL M; MEYER F; OLSEN GJ; OLSON R; OSTERMAN AL; OVERBEEK RA; MCNEIL LK; PAARMANN D; PACZIAN T; PARRELLO B; PUSCH GD; REICH C; STEVENS R; VASSIEVA O; VONSTEIN V; WILKE A; ZAGNITKO O. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9:75. DOI: 10.1186/1471-2164-9-75.
  
- ◆ BANERJEE, P.C. (2004). Genetics of metal resistance in acidophilic prokaryotes of acidic mine environments. *Indian Journal of Experimental Biology* 42(1):9-25. PMID:15274476. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/23315>.
  
- ◆ BARRETO M.; QUATRINI R.; BUENO S.; ARRIAGADA C.; VALDES J.; SILVER S.; JEDLICKI E.; HOLMES D.S. (2003). Aspects of the predicted physiology of *Acidithiobacillus ferrooxidans* deduced from an analysis of its partial genome sequence. *Hydrometallurgy* 71(1-2): 97-105. DOI: 10.1016/S0304-386X(03)00145-2
  
- ◆ BAXTER J.C.; FUNNELL B.E. (2015). Plasmid partition mechanisms. IN: *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*, 133-155. DOI: 10.1128/9781555818982.ch8
  
- ◆ BAYKOV A.; TUOMINEN H. K.; LAHTI R. (2011). The CBS Domain: A Protein Module with an Emerging Prominent Role in Regulation. *ACS Chemical Biology* 6(11):1156-1163. DOI: 10.1021/cb200231c
  
- ◆ BEN FEKIH I.; ZHANG C.; LI Y.P.; ZHAO Y.; ALWATHNANI H.A.; SAQUIB Q.; RENSING C.; CERVANTES C. (2018) Distribution of arsenic resistance genes in prokaryotes. *Frontiers in Microbiology* 9:2473. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02473
  
- ◆ BESEMER J.; LOMSADZE A.; BORODOVSKY M. (2001). GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucleic Acids Research*, 29(12), 2607–2618. DOI: 10.1093/nar/29.12.2607
  
- ◆ BHATTACHARJEE M.K.; MEYER R.J. (1993). Specific binding of MobA, a plasmid-encoded protein involved in the initiation and termination of conjugal DNA transfer, to single-stranded oriT DNA. *Nucleic Acids Research* 21 (19): 4563–4568. DOI: 10.1093/nar/21.19.4563

- ◆ BIGNELL C.; THOMAS C.M. (2001). The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. *Journal of biotechnology* 91(1): 1-34. DOI: 10.1016/S0168-1656(01)00293-0
  
- ◆ BOER D. R.; RUIZ-MASÓ J. A.; RUEDA M.; PETOUKHOV M. V.; MACHÓN C.; SVERGUN D. I.; ... COLL M. (2016). Conformational plasticity of RepB, the replication initiator protein of promiscuous streptococcal plasmid pMV158. *Scientific Reports* 6(1): 1-13. DOI: 10.1038/srep20915
  
- ◆ BOETZER M.; HENKEL C.V.; JANSEN H.J.; BUTLER D.; PIROVANO W. (2011). Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics*. 27(4):578-579. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq683
  
- ◆ BRECIK M.; CENTÁROVÁ I.; MUKHERJEE R.; KOLLY G. S.; HUSZÁR S.; BOBOVSKÁ A.; NERES J. (2015). DprE1 is a vulnerable tuberculosis drug target due to its cell wall localization. *ACS chemical biology* 10(7): 1631-1636. DOI: 10.1021/acscchembio.5b00237
  
- ◆ BRYANT, R. D., MCGROARTY, K. M., COSTERTON, J. W. & LAISHLEY, E. J. (1988). *Thiobacillus albertis* sp. nov. In Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB, List N° 25. *Int J Syst Bacteriol* 38: 220–222.
  
- ◆ BUKOWSKI M.; LYZEN R.; HELBIN W. M.; BONAR E.; SZALEWSKA-PALASZ A.; WEGRZYN G.; DUBIN G.; DUBIN A.; WLADYKA B. (2013). A regulatory role for *Staphylococcus aureus* toxin–antitoxin system PemIK<sub>Sa</sub>. *Nature Communications* 4:2012. DOI: 10.1038/ncomms3012
  
- ◆ BUKOWSKI M.; HYZ K.; JANCZAK M.; HYDZIK M.; DUBIN G.; WLADYKA B. (2017). Identification of novel mazEF/pemIK family toxin-antitoxin loci and their distribution in the *Staphylococcus* genus. *Scientific Reports* 7: 13462. DOI: 10.1038/s41598-017-13857-4
  
- ◆ BUSENLEHNER L.S.; PENNELLA M.A.; GIEDROC D.P. (2003). The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 131–143. DOI: 10.1016/S0168-6445(03)00054-8
  
- ◆ BUSTAMANTE P.; TELLO M.; ORELLANA O. (2014). Toxin-antitoxin systems in the mobile genome of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *PLoS One* 9(11): e112226. DOI: 10.1371/journal.pone.0112226
  
- ◆ BUTCHER B.G.; DEANE S.M.; RAWLINGS D.E. (2000). The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an unusual arrangement and confer increased arsenic

and antimony resistance to *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology 66 (5): 1826-1833. DOI: 10.1128/AEM.66.5.1826-1833.2000

- ◆ BUTCHER B.G.; RAWLINGS D.E. (2002). The divergent chromosomal *ars* operon of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is regulated by an atypical ArsR protein. Microbiology 148 (12): 3983-3992. DOI: 10.1099/00221287-148-12-3983
- ◆ BYRD D.R.; MATSON S.W. (1997). Nicking by transesterification: the reaction catalysed by a relaxase. Molecular Microbiology 25(6): 1011-1022. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1997.5241885.x
- ◆ CASTILLO R.; SAIER M.H. (2010). Functional promiscuity of homologues of the bacterial ArsA ATPases. International Journal of Microbiology 2010: 187373. DOI: 10.1155/2010/187373
- ◆ CCORAHUA-SANTO R.; ECA A.; ABANTO M.; GUERRA G.; RAMÍREZ P. (2017). Physiological and comparative genomic analysis of *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33 provides psychrotolerant fitness evidence for oxidation at low temperature. Research in Microbiology 168(5): 482-492. DOI: 10.1016/j.resmic.2017.01.007
- ◆ CCORAHUA R, ECA A, RAMIREZ P, ABANTO M, GARCIA-DE-LA-GUARDA R, SANCHEZ T, SÁNCHEZ J. (2021). Comparative genomic analysis of two novel plasmids from *Acidithiobacillus ferrivorans* strain PQ33. Revista Peruana de Biología 28(1): e19743. DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v28i1.19743>
- ◆ CHAKRAVARTY L., ZUPANCIC T. J., BAKER B., KITTLE J. D., FRY I. J., TUOVINEN O. H. (1995). Characterization of the pTFI91-family replicon of *Thiobacillus ferrooxidans* plasmids. Can. J. Microbiol. 41 (4-5):354-365. DOI: 10.1139/m95-048
- ◆ CHANDI G.K.; GILL B.S. (2011). Production and characterization of microbial carotenoids as an alternative to synthetic colors: a review. International Journal of Food Properties 14(3): 503-513. DOI: 10.1080/10942910903256956
- ◆ CHEN C.M., MISRA T.K., SILVER S. ROSEN B.P. (1986). Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump. The plasmid-encoded arsenical resistance operon. Journal of Biological Chemistry 261(32): 15030-15038. PMID:3021763. <http://www.jbc.org/content/261/32/15030.full.pdf>
- ◆ CHEN D.; LIN J.; CHE Y.; LIU X.; LIN J. (2011). Construction of recombinant mercury resistant *Acidithiobacillus caldus*. Microbiological Research 166(7): 515-520. DOI: 10.1016/j.micres.2010.10.003

- ◆ CHEN Y. and ROSEN B.P. (1997). Metalloregulatory Properties of the ArsD Repressor. The Journal of Biological Chemistry 272(22):14257–14262. DOI: 10.1074/jbc.272.22.14257
- ◆ CHEN Y.; YE W.; ZHANG Y.; XU Y. (2015). High speed BlastN: an accelerated MegaBLAST search tool. Nucleic Acids Research 43(16): 7762–7768. DOI: 10.1093/nar/gkv784
- ◆ CHISHOLM I.A., LEDUC L.G., FERRONI G.D. (1998). Metal resistance and plasmid DNA in *Thiobacillus ferrooxidans*. Antonie van Leeuwenhoek 73 (3):245-254. DOI: 10.1023/A:1001009931616
- ◆ CHOPRA N.; PATHAK A.; BHATNAGAR R.; BHATNAGAR S. (2013). Linkage, Mobility, and Selfishness in the MazF Family of Bacterial Toxins: A Snapshot of Bacterial Evolution. Genome Biology and Evolution. 5(12):2268–2284. doi:10.1093/gbe/evt175
- ◆ CLENNEL A. M., JOHNSTON B., RAWLINGS D. E. (1995). Structure and function of Tn5467, a Tn21-like transposon located on the *Thiobacillus ferrooxidans* broad-host-range plasmid pTF-FC2. Appl. Environ. Microbiol. 61 (12):4223-4229. PMID: 8534089.
- ◆ COKER J.A. (2016). Extremophiles and biotechnology: current uses and prospects. F1000 Research 5. DOI: 10.12688/f1000research.7432.1
- ◆ CRUZADO E.; BRAVO F. (2010). Impacto de los relaves mineros en el Perú. Informe Temático N° 021/2010-2011. Área de Servicios de Investigación. Departamento de Investigación y Documentación Parlamentaria (DIDP). Congreso de la República. Lima, Perú. Disponible en:  
[http://www2.congreso.gob.pe/Sicr/dgp/ciae.nsf/vf07web/BA9A77F64A43DBDC0525780E0070D202/\\$FILE/IT021\\_04011111.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/Sicr/dgp/ciae.nsf/vf07web/BA9A77F64A43DBDC0525780E0070D202/$FILE/IT021_04011111.pdf)
- ◆ DALE J.W.; PARK S.F. (2010). Molecular Genetics of Bacteria. 5<sup>th</sup> edition. John Wiley & Sons. 388pp. ISBN 9780470741856.
- ◆ DARLING A.C.E.; MAU B.; BLATTNER F.R.; PERNA N.T. (2004). Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence with Rearrangements. Genome Research, 14(7): 1394–1403. DOI:10.1101/gr.2289704
- ◆ DAS B.; MARTÍNEZ E.; MIDONET C.; BARRE F. X. (2013). Integrative mobile elements exploiting Xer recombination. Trends in microbiology 21(1): 23-30. DOI: 10.1016/j.tim.2012.10.003

- ◆ DASH H. R.; DAS S. (2012). Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes. *International Biodeterioration & Biodegradation* 75: 207-213. DOI: 10.1016/j.ibiod.2012.07.023
  
- ◆ DE LA CAMPA A.G.; KALE P.; SPRINGHORN S.S.; LACKS S.A. (1987). Proteins encoded by the DpnII restriction gene cassette: Two methylases and an endonuclease. *Journal of Molecular Biology* 196 (3): 457-469. DOI: 10.1016/0022-2836(87)90024-6.
  
- ◆ DE STE CROIX M.; VACCA I.; KWUN M.J.; RALPH J.D.; BENTLEY S.D.; HAIGH R.; CROUCHER N.J.; OGGIONI M.R. (2017). Phase-variable methylation and epigenetic regulation by type I restriction–modification systems. *FEMS Microbiology Reviews* 41(Supp\_1): S3-S15. DOI: 10.1093/femsre/fux025
  
- ◆ DEY S.; ROSEN B.P. (1995). Dual mode of energy coupling by the oxyanion-translocating ArsB protein. *Journal of Bacteriology* 177(2):385–389. DOI: 10.1128/jb.177.2.385-389.1995
  
- ◆ DIB J.R.; SCHULDES J.; THÜRMER A.; FARIAS M.E.; DANIEL R.; MEINHARDT F. (2013). First complete sequence of a giant linear plasmid from a micrococcus strain isolated from an extremely high-altitude lake. *Genome announcements* 1(6): e00885-13. DOI:10.1128/genomeA.00885-13
  
- ◆ DOMINY C.N., CORAM N.J., RAWLINGS D.E. (1996). Direct Submission. NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U73041>).
  
- ◆ DOMINY C.N.; DEANE S.M.; RAWLINGS D.E. (1997). A geographically widespread plasmid from *Thiobacillus ferrooxidans* has genes for ferredoxin-, FNR-, prisms- and NADH oxidoreductase-like proteins which are also located on the chromosome. *Microbiology* 143 (Pt 10):3123-3136. DOI: 10.1099/00221287-143-10-3123.
  
- ◆ DOMINY C.N.; CORAM N.J.; RAWLINGS D.E. (1998). Sequence Analysis of Plasmid pTF5, a 19.8-kb Geographically Widespread Member of the *Thiobacillus ferrooxidans* pTFI91-like Plasmid Family. *Plasmid* 40(1): 50-57. DOI: 10.1006/plas.1998.1344
  
- ◆ DORRINGTON R. A.; RAWLINGS D. E. (1989). Identification and sequence of the basic replication region of a broad-host-range plasmid isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 171 (5): 2735-2739. DOI: 10.1128/jb.171.5.2735-2739.1989
  
- ◆ DORRINGTON R. A.; RAWLINGS D. E. (1990). Characterization of the minimum replicon of the broad-host-range plasmid pTF-FC2 and similarity between pTF-FC2 and the IncQ plasmids. *Journal of Bacteriology* 172 (10): 5697-5705. DOI: 10.1128/jb.172.10.5697-5705.1990



- ◆ DORRINGTON R. A.; BARDIEN S.; RAWLINGS D. E. (1991). The broad-host-range plasmid pTF-FC2 requires a primase-like protein for autonomous replication in *Escherichia coli*. *Gene* 108 (1): 7-14. DOI: 10.1016/0378-1119(91)90481-P
  
- ◆ DRAUGHN G. L.; BOBAY B.G.; STOWE S.D.; OLSON A.L.; FELDMANN E.A.; THOMPSON R.J.; KEARNS D.B.; CAVANAGH J. (2017). Solution structures of biofilm-controlling proteins SinI and SinR from *Bacillus subtilis* reveal details of DNA-binding and regulatory mechanism. *The FASEB Journal* 31(1\_supplement): 907-2.
  
- ◆ DROLET M.; ZANGA P.; LAU P. C. K. (1990). The mobilization and origin of transfer regions of a *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid: relatedness to plasmids RSF1010 and pSC101. *Molecular Microbiology* 4 (8): 1381-1391. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1990.tb00717.x
  
- ◆ DROLET M.; LAU P. C. K. (1992). Mobilization protein, DNA binding and divergent transcription at the transfer origin of *Thiobacillus ferrooxidans* pTF1 plasmid. *Molecular Microbiology* 6 (8):1061-1071. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb02171.x
  
- ◆ ECA A. (2016). Caracterización molecular de plásmidos de *Acidithiobacillus* sp. aislados de zonas mineras del Perú. Tesis para optar al Título de Biólogo-Microbiólogo-Parasitólogo, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/6087>
  
- ◆ FALAGÁN C.; JOHNSON D. B. (2016). *Acidithiobacillus ferriphilus* sp. nov., a facultatively anaerobic iron- and sulfur-metabolizing extreme acidophile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66:206–211. DOI: 10.1099/ijsem.0.000698
  
- ◆ FASHOLA M.; NGOLE-JEME V.; BABALOLA O. (2016). Heavy metal pollution from gold mines: Environmental effects and bacterial strategies for resistance. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 13(11):1047. DOI: 10.3390/ijerph13111047.
  
- ◆ FERNÁNDEZ M.; MOREL B.; RAMOS J.L.; KRELL T. 2016. Paralogous regulators ArsR1 and ArsR2 of *Pseudomonas putida* KT2440 as a basis for arsenic biosensor development. *Appl Environ Microbiol* 82:4133–4144. DOI:10.1128/AEM.00606-16.
  
- ◆ FIEBIG A.; CASTRO ROJAS C.M.; SIEGAL-GASKINS D.; CROSSON S. (2010). Interaction specificity, toxicity and regulation of a paralogous set of ParE/RelE-family toxin–antitoxin systems. *Molecular microbiology* 77(1): 236-251. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07207.x

- ◆ FRAIKIN N.; ROUSSEAU C.J.; GOEDERS N.; VAN MELDEREN L. (2019). Reassessing the Role of the Type II MqsRA Toxin-Antitoxin System in Stress Response and Biofilm Formation: *mqsA* Is Transcriptionally Uncoupled from *mqsR*. MBio 10(6): e02678-19. DOI: 10.1128/mBio.02678-19.
  
- ◆ FRASER P. D.; MISAWA N.; LINDEN H.; YAMANO S.; KOBAYASHI K.; SANDMANN G. (1992). Expression in *Escherichia coli*, purification, and reactivation of the recombinant *Erwinia uredovora* phytoene desaturase. Journal of Biological Chemistry 267(28): 19891-19895. PMID: 1400305.
  
- ◆ GARCIA-PINO A.; CHRISTENSEN-DALSGAARD M.; WYNS L.; YARMOLINSKY M.; MAGNUSON R.D.; GERDES K.; LORIS R. (2008). Doc of prophage P1 is inhibited by its antitoxin partner Phd through fold complementation. Journal of Biological Chemistry 283(45): 30821-30827. DOI: 10.1074/jbc.M805654200
  
- ◆ GARDNER M.N.; DEANE S.M.; RAWLINGS D.E. (2001). Isolation of a new broad-host-range IncQ-like plasmid, pTC-F14, from the acidophilic bacterium *Acidithiobacillus caldus* and analysis of the plasmid replicon. Journal of Bacteriology 183(11): 3303-3309. DOI: 10.1128/JB.183.11.3303-3309.2001
  
- ◆ GARDNER M. N.; RAWLINGS D. E. (2004). Evolution of compatible replicons of the related IncQ-like plasmids, pTC-F14 and pTF-FC2. Microbiology 150: 1797-1808. DOI: 10.1099/mic.0.26951-0
  
- ◆ GARGARELLO R.M.; DI GREGORIO D.; HUCK H.; NIELLO J.F.; CURUTCHET G. (2010). Reduction of uranium (VI) by *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Hydrometallurgy, 104(3-4), 529-532. DOI: 10.1016/j.hydromet.2010.03.032
  
- ◆ GARNIER T.; SAURIN W.; COLE S.T. (1987). Molecular characterization of the resolvase gene, *res*, carried by a multicopy plasmid from *Clostridium perfringens*: common evolutionary origin for prokaryotic site-specific recombinases. Molecular microbiology 1(1): 371-376. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1987.tb01944.x
  
- ◆ GARRITY G. M.; BELL J. A.; LILBURN T. (2005a). Phylum XIV. Proteobacteria phyl. nov. class III. Gammaproteobacteria class. nov. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 2, p. 1. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer.
  
- ◆ GARRITY G. M.; BELL J. A.; LILBURN T. (2005b). Order II. Acidithiobacillales ord. nov. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 2, p. 60. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley and G. M. Garrity. New York: Springer.

- ◆ GARRITY G. M.; BELL J. A.; LILBURN T. (2005c). Family I. Acidithiobacillaceae fam. nov. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 2, p. 60. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley and G. M. Garrity. New York: Springer.
  
- ◆ GERDES K.; CHRISTENSEN S. K.; LØBNER-OLESEN A. (2005). Prokaryotic Toxin–Antitoxin Stress Response Loci. *Nature Reviews Microbiology* 3: 371-382. DOI: 10.1038/nrmicro1147
  
- ◆ GOLDSCHMIDT G.K.; GARDNER M.N.; VAN ZYL L.J.; DEANE S.M.; RAWLINGS D.E. (2003). A promiscuous, broad-host range, IncQ-like plasmid isolated from an industrial strain of *Acidithiobacillus caldus*, its accessory DNA and potential to participate in the horizontal gene pool of biomining and other bacteria. In *Biohydrometallurgy: a sustainable technology in evolution. Selected papers from the 15th Int. Biohydrometall. Symp., Athens, Greece (Vol. 14, pp. 1249-1259).*
  
- ◆ GRANINGER M.; NIDETZKY B.; HEINRICHS D. E.; WHITFIELD C.; MESSNER P. (1999). Characterization of dTDP-4-dehydrorhamnose 3, 5-epimerase and dTDP-4-dehydrorhamnose reductase, required for dTDP-L-rhamnose biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Journal of Biological Chemistry* 274(35): 25069-25077. DOI: 10.1074/jbc.274.35.25069
  
- ◆ GRANINGER M.; KNEIDINGER B.; BRUNO K.; SCHEBERL A.; MESSNER P. (2002). Homologs of the Rml enzymes from *Salmonella enterica* are responsible for dTDP-β-L-rhamnose biosynthesis in the gram-positive thermophile *Aneurinibacillus thermoaerophilus* DSM 10155. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(8): 3708-3715. DOI: 10.1128/AEM.68.8.3708-3715.2002
  
- ◆ GRANT J.R.; STOTHARD P. (2008) The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res* 36 (suppl\_2): W181-W184. DOI: 10.1093/nar/gkn179
  
- ◆ GROVE A. (2013). MarR family transcription factors. *Current Biology* 23(4): R142-R143. DOI: 10.1016/j.cub.2013.01.013
  
- ◆ GUÉROUT A.M.; IQBAL N.; MINE N.; DUCOS-GALAND M.; VAN MELDEREN L.; MAZEL D. (2013). Characterization of the *phd-doc* and *ccd* toxin-antitoxin cassettes from *Vibrio* superintegrons. *Journal of Bacteriology* 195(10): 2270-2283. DOI: 10.1128/JB.01389-12
  
- ◆ GUNN J. S.; BAKALETZ L. O.; WOZNIAK D. J. (2016). What's on the outside matters: the role of the extracellular polymeric substance of gram-negative biofilms in evading host immunity and

as a target for therapeutic intervention. *Journal of Biological Chemistry* 291(24): 12538-12546. DOI: 10.1074/jbc.R115.707547

- ◆ HALLBERG K.B.; LINDSTRÖM E.B. (1994). Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. *Microbiology* 140(12): 3451-3456. DOI: 10.1099/13500872-140-12-3451
- ◆ HALLBERG K. B.; GONZÁLEZ-TORIL E.; JOHNSON D. B. (2010). *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles* 14, 9–19. DOI 10.1007/s00792-009-0282-y.
- ◆ HALLET B.; ARCISZEWSKA L. K.; SHERRATT D. J. (1999). Reciprocal control of catalysis by the tyrosine recombinases XerC and XerD: an enzymatic switch in site-specific recombination. *Molecular cell* 4(6): 949-959. DOI: 10.1016/S1097-2765(00)80224-5
- ◆ HAYES F.; BARILLÀ D. (2010) Extrachromosomal Components of the Nucleoid: Recent Developments in Deciphering the Molecular Basis of Plasmid Segregation. In: Dame R.T., Dorman C.J. (eds) *Bacterial Chromatin*. Springer, Dordrecht. DOI: 10.1007/978-90-481-3473-1\_4
- ◆ HEDRICH S.; JOHNSON D. B. (2013). *Acidithiobacillus ferridurans* sp. nov., an acidophilic iron-, sulfur- and hydrogen-metabolizing chemolithotrophic gammaproteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63: 4018–4025. DOI: 10.1099/ij.s.0.049759-0.
- ◆ HERNÁNDEZ-ARRIAGA A.M.; CHAN W.T.; ESPINOSA M.; DÍAZ-OREJAS R. (2015). Conditional Activation of Toxin-Antitoxin Systems: Postsegregational Killing and Beyond. IN: *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*, 175-192. DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0009-2013.
- ◆ HERNÁNDEZ-RAMÍREZ K.C., REYES-GALLEGOS R.I., CHÁVEZ-JACOBO V.M., DÍAZ-MAGAÑA A., MEZA-CARMEN V., RAMÍREZ-DÍAZ M.I. (2018). A plasmid-encoded mobile genetic element from *Pseudomonas aeruginosa* that confers heavy metal resistance and virulence. *Plasmid* 98: 15–21. DOI: 10.1016/j.plasmid.2018.07.003.
- ◆ HOLMES D. S., LOBOS J. H., BOPP L. H., WELCH G. C. (1984). Cloning of a *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 157 (1):324-326. PMID: 6361001

- ◆ HUANG X., MADAN A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research* 9(9): 868-877. DOI: 10.1101/gr.9.9.868
  
- ◆ HUERTA-CEPAS J., SZKLARCZYK D., HELLER D., HERNÁNDEZ-PLAZA A., FORSLUND S. K., COOK H., MENDE D.R., LETUNIC I., RATTEI T., JENSEN L.J., VON MERING C., BORK P. (2018). eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic acids research* 47(D1), D309-D314. DOI: 10.1093/nar/gky1085
  
- ◆ JACKSON C.R.; DUGAS S.L. (2003). Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal *arsC* gene sequences suggests an ancient, common origin for arsenate reductase. *BMC Evolutionary Biology* 3(1): 18. DOI: 10.1186/1471-2148-3-18
  
- ◆ JEREZ C.A. (2009). Metal Extraction and Biomining. *Encyclopedia of Microbiology*. Third ed. Elsevier, pp. 407–420. Disponible en: [http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/119928/Jerez\\_Metal\\_Extraction\\_and\\_Biomining.pdf?sequence=1](http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/119928/Jerez_Metal_Extraction_and_Biomining.pdf?sequence=1)
  
- ◆ JEREZ C.A. (2017). Biomining of metals: how to access and exploit natural resource sustainably. *Microbial Biotechnology* 10(5): 1191-1193. DOI: 10.1111/1751-7915.12792
  
- ◆ JI G.; SILVER S. (1992). Regulation and expression of the arsenic resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid pl258. *Journal of Bacteriology*, 174(11), 3684-3694. PMID: 1534328.
  
- ◆ JIANG H.; LIANG Y.; YIN H.; XIAO Y.; GUO X.; XU Y.; LIU X. (2015). Effects of arsenite resistance on the growth and functional gene expression of *Leptospirillum ferriphilum* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in pure culture and coculture. *BioMed Research International* 2015: 203197. DOI: 10.1155/2015/203197
  
- ◆ JOFRÉ E.; LAGARES A.; MORI G. (2004). Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. *FEMS microbiology letters* 231(2): 267-275. DOI: 10.1016/S0378-1097(04)00003-5.
  
- ◆ JOHNSON T.J.; SHEPARD S.M. RIVET B.; DANZEISEN J.L.; CARATTOLI A. (2011). Comparative genomics and phylogeny of the Inc11 plasmids: a common plasmid type among porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Plasmid* 66(3), 144-151. DOI: 10.1016/j.plasmid.2011.07.003

- ◆ JOHNSTON C.; POLARD P.; CLAVERY J-P. (2013). The DpnI/DpnII pneumococcal system, defense against foreign attack without compromising genetic exchange. *Mob Genet Elements* 3:e25582. DOI: 10.4161/mge.25582
  
- ◆ KALIA K.; JOSHI D. N. (2009). Detoxification of arsenic. In *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents* (pp. 1083-1100). Academic Press. DOI: 10.1016/B978-012374484-5.00072-9
  
- ◆ KAMASHEV D.; AGAPOVA Y.; RASTORGUEV S.; TALYZINA A.A.; BOYKO K.M.; KORZHENEVSKIY D.A.; VLASKINA A.; VASILOV R.; VLADIMIR I.T., RAKITINA, T.V. (2017). Comparison of histone-like HU protein DNA-binding properties and HU/IHF protein sequence alignment. *PloS one* 12(11): e0188037. DOI: 10.1371/journal.pone.0188037
  
- ◆ KAUR S.; KAMLI M.R.; ALI A. (2009). Diversity of arsenate reductase genes (arsC genes) from arsenic-resistant environmental isolates of *E. coli*. *Current Microbiology* 59(3): 288-294. DOI: 10.1007/s00284-009-9432-9
  
- ◆ KELLY D. P.; WOOD A. P. (2000). Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 511–516.
  
- ◆ KELLY D. P.; WOOD A. P. (2005). Genus I. *Acidithiobacillus* Kelly and Wood 2000. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2, pp. 60–62. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer.
  
- ◆ KIPREOS E.T.; PAGANO M. (2000). The F-box protein family. *Genome biology* 1(5), REVIEWS 3002. DOI:10.1186/gb-2000-1-5-reviews3002.
  
- ◆ KNUDSEN P. K.; GAMMELSRUD K. W.; ALFSNES K.; STEINBAKK M.; ABRAHAMSEN T. G.; MÜLLER F.; BOHLIN J. (2018). Transfer of a *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-carrying plasmid between different *Escherichia coli* strains within the human gut explored by whole genome sequencing analyses. *Scientific Reports* 8(1): 280. DOI: 10.1038/s41598-017-18659-2
  
- ◆ KONDRAT'EVA T.F., AGEEVA S.N., MUNTYAN L.N., PIVOVAROVA T.A., KARAVAIKO G.I. (2002). *Microbiology* 71 (3): 319-325. DOI: 10.1023/A:1015810829299
  
- ◆ KOPFMANN S.; ROESCH S. K.; HESS W. R. (2016). Type II Toxin–Antitoxin Systems in the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Toxins* 8: 228. DOI: 10.3390/toxins8070228.

- ◆ KOSKINIEMI S.; GIBBONS H. S.; SANDEGREN L.; ANWAR N.; OUELLETTE G.; BROOMALL S.; ... MCNEW L. (2013). Pathoadaptive mutations in *Salmonella enterica* isolated after serial passage in mice. PloS one 8(7): e70147. DOI: 10.1371/journal.pone.0070147
  
- ◆ KUMAR S.; STECHER G.; TAMURA K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular Biology and Evolution 33(7): 1870-1874. DOI: 10.1093/molbev/msw054
  
- ◆ KWAN B.W.; LORD D.M.; PETI W.; PAGE R.; BENEDIK M.J.; WOOD T.K. (2015). The MqsR/MqsA toxin/antitoxin system protects *Escherichia coli* during bile acid stress. Environmental Microbiology 17(9): 3168-3181. DOI: 10.1111/1462-2920.12749.
  
- ◆ LARKIN M.A.; BLACKSHIELDS G.; BROWN N.P.; CHENNA R.; McGETTIGAN P.A.; McWILLIAM H.; VALENTIN F.; WALLACE I.M.; WILM A.; LOPEZ R.; THOMPSON J.D.; GIBSON T.J.; HIGGINS D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23(21): 2947-2948. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm404
  
- ◆ LE S.Q.; GASCUEL O. (2008). An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. Molecular Biology and Evolution 25(7):1307-1320. DOI:10.1093/molbev/msn067.
  
- ◆ LEONARD T.A.; MØLLER-JENSEN J.; LÖWE J. (2005). Towards understanding the molecular basis of bacterial DNA segregation. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 360(1455): 523-535. DOI: 10.1098/rstb.2004.1608
  
- ◆ LETUNIC I., BORK P. (2006). Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. Bioinformatics 23(1): 127-128. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl529. iTOL is available through at <https://itol.embl.de>
  
- ◆ LI R.; HAILE J.D.; KENNELLY P.J. (2003). An arsenate reductase from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 exhibits a novel combination of catalytic characteristics. J. Bacteriol. 185: 6780–6789. DOI: 10.1128/JB.185.23.6780-6789.2003
  
- ◆ LILJEQVIST M.; VALDES J.; HOLMES D.S.; DOPSON M. (2011). Draft genome of the psychrotolerant acidophile *Acidithiobacillus ferrivorans* SS3. Journal of Bacteriology 193 (16): 4304–4305. DOI: 10.1128/JB.05373-11
  
- ◆ LILJEQVIST M.; OSSANDON F.J.; GONZÁLEZ C.; RAJAN S.; STELL A.; VALDES J.; HOLMES D.S.; DOPSON M. (2015). Metagenomic analysis reveals adaptations to a cold-adapted lifestyle in a low-temperature acid mine drainage stream. FEMS Microbiology Ecology 91 (4). DOI: 10.1093/femsec/fiv011



- ◆ LIN Y.F.; WALMSLEY A.R.; ROSEN, B.P. (2006). An arsenic metallochaperone for an arsenic detoxification pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 15617–15622. DOI: 10.1073/pnas.0603974103
  
- ◆ LIU H L.; CHE B.Y.; LAN Y.W.; CHENG Y.C. (2004). Biosorption of Zn (II) and Cu (II) by the indigenous *Thiobacillus thiooxidans*. *Chemical Engineering Journal* 97(2-3): 195-201. DOI: 10.1016/S1385-8947(03)00210-9
  
- ◆ MAKAROVA K. S., WOLF Y. I., KOONIN E. V. (2009). Comprehensive comparative-genomic analysis of Type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biology Direct* 4:19. DOI:10.1186/1745-6150-4-19.
  
- ◆ MAO M. W. H., DUGAN P. R., MARTIN P. A. W., TUOVINEN O. H. (1980). Plasmid DNA in chemoorganotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus acidophilus*. *FEMS Microbiology Letters* 8 (3):121-125. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1980.tb05063.x
  
- ◆ MARRUECOS L.; NOGUÉ S.; NOLLA J. (1993). *Toxicología clínica*. Barcelona. Springer-Verlag Ibérica.
  
- ◆ MARTIN P. A. W., DUGAN P. R., TUOVINEN O. H. (1981). Plasmid DNA in acidophilic, chemolithotrophic thiobacilli. *Canadian Journal of Microbiology* 27 (8):850-853. DOI: 10.1139/m81-133
  
- ◆ MARTIN P. A. W., DUGAN P. R., TUOVINEN O. H. (1983). Uranium resistance of *Thiobacillus ferrooxidans*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 18 (6): 392-395. DOI: 10.1007/BF00504751
  
- ◆ MARTIN P.; DEMEL S.; SHI J.; GLADYSHEVA T.; GATTI D.L.; ROSEN B.P.; EDWARDS B.F. (2001). Insights into the structure, solvation, and mechanism of ArsC arsenate reductase, a novel arsenic detoxification enzyme. *Structure* 9 (11): 1071-1081. DOI: 10.1016/S0969-2126(01)00672-4
  
- ◆ MARTÍNEZ-BUSSENIUS C.; NAVARRO C.A.; ORELLANA L.; PARADELA A.; JEREZ C.A. (2016). Global response of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 to high concentrations of copper: A quantitative proteomics approach. *Journal of Proteomics* 145: 37-45. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.03.039

- ◆ MATCHER G. F.; RAWLINGS D. E. (2009). The effect of the location of the proteic post-segregational stability system within the replicon of plasmid pTF-FC2 on the fine regulation of plasmid replication. *Plasmid* 62 (2): 98-107. DOI: 10.1016/j.plasmid.2009.05.003
  
- ◆ MATHEMA V.B., THAKURI B.C., SILLANPÄÄ M. (2011). Bacterial *mer* operon-mediated detoxification of mercurial compounds: a short review. *Arch Microbiol* 193: 837. DOI: 10.1007/s00203-011-0751-4
  
- ◆ McLEAN M.M.; CHANG Y.; DHAR G.; HEISS J.K.; JOHNSON R.C. (2013). Multiple interfaces between a serine recombinase and an enhancer control site-specific DNA inversion. *Elife* 2: e01211. DOI: 10.7554/eLife.01211
  
- ◆ MÉNDEZ-GARCÍA C.; PELÁEZ A.I.; MESA V.; SÁNCHEZ J.; GOLYSHINA O.V.; FERRER M. (2015). Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. *Frontiers in Microbiology* 6:475. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00475.
  
- ◆ MENG YL, LIU Z, ROSEN BP. (2004). As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 279(18):18334-18341. DOI: 10.1074/jbc.M400037200.
  
- ◆ MO H.; CHEN Q.; DU J.; TANG L.; QIN F.; MIAO B.; WU X.; ZENG J. (2011). Ferric reductase activity of the ArsH protein from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21 (5):464–469. DOI: 10.4014/jmb.1101.01020
  
- ◆ NASCIMENTO A.M.; CHARTONE-SOUZA, E. (2003). Operon *mer*: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genetics and Molecular Research* 2(1): 92-101. PMID: 12917805
  
- ◆ NATARAJAN K.A. (2008). Microbial aspects of acid mine drainage and its bioremediation. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 18(6): 1352-1360. DOI: 10.1016/S1003-6326(09)60008-X
  
- ◆ NAVARRO C.A.; VON BERNATH D.; JEREZ C.A. (2013). Heavy metal resistance strategies of acidophilic bacteria and their acquisition: importance for biomining and bioremediation. *Biological Research* 46(4): 363-371. DOI: 10.4067/S0716-97602013000400008
  
- ◆ NEWMAN J.A.; RODRIGUES C.; LEWIS R.J. (2013). Molecular basis of the activity of SinR protein, the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* 288(15): 10766-10778. DOI: 10.1074/jbc.M113.455592

- ◆ NI Y.Q.; HE K.Y.; BAO J.T.; WAN D.S.; LI H.Y. (2008) Genomic and phenotypic heterogeneity of *Acidithiobacillus* spp. strains isolated from diverse habitats in China. FEMS Microbiol Ecol 64:248–259. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00457.x
- ◆ NISHIZAWA T.; TAGO K.; OSHIMA K.; HATTORI M.; ISHII S.; OTSUKA S.; SENOO K. (2012). Complete genome sequence of the denitrifying and N<sub>2</sub>O-reducing bacterium *Azoarcus* sp. strain KH32C. DOI: 10.1128/JB.06618-11
- ◆ NITHYA N.; REMITHA R.; JAYASREE P.R.; FAISAL M.; KUMAR P.M. (2017). Analysis of beta-lactamases, *bla*<sub>NDM-1</sub> phylogeny & plasmid replicons in multidrug-resistant *Klebsiella* spp. from a tertiary care centre in south India. The Indian Journal of Medical Research, 146 (Suppl 1), S38. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR\_31\_16
- ◆ OVERBEEK R.; OLSON R.; PUSCH G.D.; OLSEN G. J.; DAVIS J.J.; DISZ T.; STEVENS R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). Nucleic Acids Research, 42 (Database issue): D206–D214. DOI: 10.1093/nar/gkt1226
- ◆ PAGE R.; PETI W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. Nature Chemical Biology 12 (4): 208–214. DOI: 10.1038/nchembio.2044
- ◆ PAL C., BENGTSSON-PALME J., KRISTIANSSON E., LARSSON D.G. (2015). Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. BMC Genomics 16(964): 1-14. DOI: 10.1186/s12864-015-2153-5
- ◆ PENG T., MA L., FENG X., TAO J., NAN M., LIU Y., LI J., SHEN L., WU X., YU R., LIU X., QIU G., ZENG W. (2017). Genomic and transcriptomic analyses reveal adaptation mechanisms of an *Acidithiobacillus ferrivorans* strain YL15 to alpine acid mine drainage. PLoS ONE 12(5): e0178008. DOI: 10.1371/journal.pone.0178008.
- ◆ PETERSEN J. (2011). Phylogeny and compatibility: plasmid classification in the genomics era. Archives of Microbiology 193 (5): 313-321. DOI: 10.1007/s00203-011-0686-9
- ◆ PRAMILA T., RAO G.R., NATARAJAN K. A., RAO C.D. (1996). Differential influence of ions on the copy number of plasmids in *Thiobacillus ferrooxidans*, Curr Microbiol, 32 (2):57-63. DOI: 10.1007/s002849900010
- ◆ PRAMILA T., RAO C.D., RAO G.R. (2016). Complete nucleotide sequence of pTF4.1, a 4.1 kb plasmid from *Thiobacillus ferrooxidans*. NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/X96982>).

- ◆ QIN J.; ROSEN B.P.; ZHANG Y.; WANG G.; FRANKE S.; RENSING C. (2006). Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7), 2075-2080. DOI: 10.1073/pnas.0506836103
  
- ◆ QUATRINI R.; JOHNSON D.B. (2019). *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Trends in Microbiology* 27(3): 282-283. DOI: 10.1016/j.tim.2018.11.009
  
- ◆ RAJEEV L.; MALANOWSKA K.; GARDNER J. F. (2009). Challenging a paradigm: the role of DNA homology in tyrosine recombinase reactions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73(2): 300-309. DOI: 10.1128/MMBR.00038-08
  
- ◆ RAMBAUT A. (2018). FigTree, version 1.4.4. Available online at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
  
- ◆ RAMÍREZ-DÍAZ M.I., DÍAZ-MAGAÑA A., MEZA-CARMEN V., JOHNSTONE L., CERVANTES C., RENSING C. (2011). Nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* conjugative plasmid pUM505 containing virulence and heavy-metal resistance genes. *Plasmid* 66: 7–18. DOI: 10.1016/j.plasmid.2011.03.002
  
- ◆ RAWLINGS D. E., PRETORIUS I. M., WOODS D. R. (1984). Expression of a *Thiobacillus ferrooxidans* origin of replication in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 158 (2) 737-738. PMID: 6373729
  
- ◆ RAWLINGS D. E., WOODS D. R. (1985). Mobilization of *Thiobacillus ferrooxidans* plasmids among *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (5):1323-1325. PMID: 3890747.
  
- ◆ RAWLINGS D. E., PRETORIUS I. M., WOODS D. R. (1986). Expression of *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid functions and the development of genetic systems for the thiobacilli. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 16 (16): 281-287.
  
- ◆ RAWLINGS D. E., DORRINGTON R. A., ROHRER J., CLENNEL A. M. (1993). A molecular analysis of a broad-host-range plasmid isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Reviews* 11 (1-3): 3-7. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00260.x.
  
- ◆ RAWLINGS D. E. (1999). Proteic toxin-antitoxin, bacterial plasmid addiction systems and their evolution with special reference to the pas system of pTF-FC2. *FEMS Microbiology Letters* 176 (2): 269–277. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13672.x

- ◆ RAWLINGS D. E. (2002). Heavy metal mining using microbes. *Annual Review of Microbiology* 56:65–91. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161052.
- ◆ RAWLINGS D.E. (2008). High level arsenic resistance in bacteria present in biooxidation tanks used to treat gold-bearing arsenopyrite concentrates: A review. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 18(6): 1311-1318. DOI: 10.1016/S1003-6326(09)60003-0
- ◆ REYES Y.; VERGARA I.; TORRES O.; LAGOS M.D.; JIMENEZ E.E.G. (2016). Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Ingeniería Investigación y Desarrollo* 16 (2): 66-77. DOI: 10.19053/1900771X.v16.n2.2016.5447
- ◆ ROBERTO F.F. (2003). Nucleotide sequence of a small cryptic plasmid from *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain A-6. *Hydrometallurgy* 71(1-2): 133-137. DOI: 10.1016/S0304-386X(03)00149-X
- ◆ RODIONOV O.; YARMOLINSKY M. (2004). Plasmid partitioning and the spreading of P1 partition protein ParB. *Molecular microbiology* 52(4): 1215-1223. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04055.x
- ◆ RODRÍGUEZ HEREDIA, D. (2017). Intoxicación ocupacional por metales pesados. *MEDISAN* 21(12): 3372-3385. Disponible en:  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1029-30192017001200012&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192017001200012&lng=es&nrm=iso); <http://medisan.sld.cu/index.php/san/article/view/1089>
- ◆ ROHRER J.; RAWLINGS D. E. (1992). Sequence analysis and characterization of the mobilization region of a broad-host-range plasmid, pTF-FC2, isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 174 (19): 6230-6237. DOI: 10.1128/jb.174.19.6230-6237.1992
- ◆ ROMERO-GONZÁLEZ M.; NWAABI B.C.; HUFTON J.M.; GILMOUR D.J. (2016). Ex-situ Bioremediation of U(VI) from Contaminated Mine Water Using *Acidithiobacillus ferrooxidans* Strains. *Front. Environ. Sci.* 4:39. DOI: 10.3389/fenvs.2016.00039
- ◆ ROOS G., BUTS L., VAN BELLE K., BROSENS E., GEERLINGS P., LORIS R., WYNS L., MESSENS J. (2006). Interplay between ion binding and catalysis in the thioredoxin-coupled arsenate reductase family. *J. Mol. Biol.* 360:826-838. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.05.054
- ◆ ROSEN B.P. (1990). The plasmid-encoded arsenical resistance pump: An anion-translocating ATPase. *Research in Microbiology* 141(3): 336-341. DOI: 10.1016/0923-2508(90)90008-E

- ◆ RYAN D.; COLLERAN E. (2002). Arsenical resistance in the IncHI2 plasmids. *Plasmid* 47 (3): 234-240. DOI: 10.1016/S0147-619X(02)00012-4
- ◆ SAAVEDRA DE BAST M.; MINE N.; VAN MELDEREN L. (2008). Chromosomal toxin-antitoxin systems may act as antiaddiction modules. *Journal of Bacteriology* 190 (13):4603-4609. DOI: 10.1128/JB.00357-08
- ◆ SALTIKOV C.W.; CIFUENTES A.; VENKATESWARAN K.; NEWMAN D.K. (2003). The *ars* detoxification system is advantageous but not required for As (V) respiration by the genetically tractable *Shewanella* species strain ANA-3. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (5): 2800-2809. DOI: 10.1128/AEM.69.5.2800-2809.2003
- ◆ SAN FRANCISCO M.J., HOPE C.L., OWOLABI J.B., TISA L.S., ROSEN B.P. (1990). Identification of the metalloregulatory element of the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *Nucleic Acids Research*, 18(3), 619-624. DOI: 10.1093/nar/18.3.619
- ◆ SANDMANN G. (1994). Phytoene desaturase: genes, enzymes and phylogenetic aspects. *Journal of plant physiology* 143(4-5): 444-447. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)81805-5
- ◆ SCHIPPERS A.; HEDRICH S.; VASTERS J.; DROBE M.; SAND W.; WILLSCHER S. (2013). Biomining: metal recovery from ores with microorganisms. In: Schippers A., Glombitza F., Sand W. (eds) *Geobiotechnology I. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 141: 1-47. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: 10.1007/10\_2013\_216
- ◆ SCHRADER J.A.; HOLMES D.S. (1988) Phenotypic switching of *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 170:3915–3923. DOI: 10.1128/jb.170.9.3915-3923.1988
- ◆ SEEMANN T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30(14): 2068-2069. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu153
- ◆ SHIRATORI T.; INOUE C.; NUMATA M.; KUSANO T. (1991). Characterization and cloning of plasmids from the iron-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Current Microbiology* 23(6): 321-326. DOI: 10.1007/BF02104133
- ◆ SILVER S., PHUNG L.T. (2005). Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (2): 599-608. DOI: 10.1128/AEM.71.2.599-608.2005
- ◆ SMALLA K.; JECHALKE S.; TOP E.M. (2015). Plasmid detection, characterization and ecology. *Microbiology Spectrum* 3(1). DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0038-2014.

- ◆ SMITH A.S.G.; RAWLINGS D.E. (1997). The poison–antidote stability system of the broad-host-range *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid pTF-FC2. *Molecular Microbiology* 26 (5): 961-970. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1997.6332000.x
  
- ◆ SMITH A.S.G.; RAWLINGS D.E. (1998a). Efficiency of the pTF-FC2 pasPoison-Antidote Stability System in *Escherichia coli* is affected by the host strain, and antidote degradation requires the Lon Protease. *Journal of Bacteriology* 180 (20): 5458-5462. DOI:
  
- ◆ SMITH A.S.G.; RAWLINGS D.E. (1998b). Autoregulation of the pTF-FC2 Proteic Poison-Antidote Plasmid Addiction System (pas) is essential for plasmid stabilization. *Journal of Bacteriology* 180 (20): 5463-5465. PMID: 9765582
  
- ◆ STOTHARD P.; WISHART, D.S. (2005). Circular genome visualization and exploration using CGView. *Bioinformatics*, 21(4), 537-539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti054
  
- ◆ SULLIVAN M.J.; PETTY N.K.; BEATSON S.A. (2011). Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics* 27 (7):1009-1010. DOI:10.1093/bioinformatics/btr039.
  
- ◆ SUN C.; GUO Y.; TANG K.; WEN Z.; LI B.; ZENG Z.; WANG X. (2017). MqsR/MqsA toxin/antitoxin system regulates persistence and biofilm formation in *Pseudomonas putida* KT2440. *Frontiers in Microbiology* 8: 840. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00840.
  
- ◆ SUZUKI K.; WAKAO N.; KIMURA T.; SAKKA K.; OHMIYA K. (1998). Expression and regulation of the arsenic resistance operon of *Acidiphilium multivorum* AIU 301 plasmid pKW301 in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 64(2): 411-418. PMID: 9464374
  
- ◆ TAKEUCHI F.; SUGIO T. (2006). Volatilization and recovery of mercury from mercury-polluted soils and wastewaters using mercury-resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains SUG 2-2 and MON-1. *Environmental sciences: an international journal of environmental physiology and toxicology*, 13(6): 305-316. PMID: 17273146
  
- ◆ TATUSOV T.; TATUSOV R. (2015). ORF Finder. Online Software [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>].
  
- ◆ TEMPLE K.L.; COLMER A.R. (1951). The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 62(5): 605-611. PMID: 14897836
  
- ◆ THE UNIPROT CONSORTIUM. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 47: D506-515. DOI: 10.1093/nar/gky1049



- ◆ TISA L.S.; ROSEN B.P. (1990). Molecular characterization of an anion pump. The ArsB protein is the membrane anchor for the ArsA protein. *Journal of Biological Chemistry* 265 (1): 190-194. PMID: 1688427
  
- ◆ TRAN T.T.T.; MANGENOT S.; MAGDELENAT G.; PAYEN E.; ROUY Z.; BELAHBIB H.; GRAIL B.M.; JOHNSON D.B.; BONNEFOY V; TALLA E. (2017). Comparative genome analysis provides insights into both the lifestyle of *Acidithiobacillus ferrivorans* strain CF27 and the chimeric nature of the iron-oxidizing acidithiobacilli genomes. *Front. Microbiol.* 8:1009. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01009.
  
- ◆ TUFFIN I.M.; DE GROOT P.; DEANE S.M.; RAWLINGS D.E. (2005). An unusual Tn21-like transposon containing an *ars* operon is present in highly arsenic-resistant strains of the biomining bacterium *Acidithiobacillus caldus*. *Microbiology* 151 (9): 3027-3039. DOI: 10.1099/mic.0.28131-0
  
- ◆ TUFFIN I.M.; HECTOR S.B.; DEANE S.M.; RAWLINGS D.E. (2006). Resistance determinants of a highly arsenic-resistant strain of *Leptospirillum ferriphilum* isolated from a commercial biooxidation tank. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2247–2253. DOI: 10.1128/AEM.72.3.2247-2253.2006
  
- ◆ UNTERHOLZNER S. J.; POPPENBERGER B.; ROZHON W. (2013). Toxin–antitoxin systems: biology, identification, and application. *Mobile Genetics Elements* 3 (5): e26219. DOI: 10.4161/mge.26219
  
- ◆ VALDÉS J.; PEDROSO I.; QUATRINI R.; DODSON R. J.; TETTELIN H.; BLAKE II R.; EISEN J. A.; HOLMES D. S. (2008). *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics* 9:597. DOI: 10.1186/1471-2164-9-597. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/597>.
  
- ◆ VALDÉS J.; QUATRINI R.; HALLBERG K.; DOPSON M.; VALENZUELA P. D. T.; HOLMES D. S. (2009). Draft genome sequence of the extremely acidophilic bacterium *Acidithiobacillus caldus* ATCC 51756 reveals metabolic versatility in the genus *Acidithiobacillus*. *Journal of Bacteriology* 191 (18): 5877-5878. DOI: 10.1128/JB.00843-09
  
- ◆ VAN ZYL L.J.; DEANE S.H.; LOUW L.A.; RAWLINGS D.E. (2008). Presence of a family of plasmids (29 to 65 Kilobases) with a 26-Kilobase common region in different strains of the sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus caldus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (14): 4300-4308. DOI: 10.1128/AEM.00864-08

- ◆ VARSAKI A.; LUCAS M.; AFENDRA A.S.; DRAINAS C.; DE LA CRUZ F. (2003). Genetic and biochemical characterization of MbeA, the relaxase involved in plasmid ColE1 conjugative mobilization. *Molecular Microbiology* 48(2): 481-493. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03441.x
  
- ◆ VARSAKI A.; LAMB H. K.; ELEFThERIADOU O.; VANDERA E.; THOMPSON P.; MONCALIÁN G.; DE LA CRUZ F.; HAWKINS A.; DRAINAS C. (2012). Interaction between relaxase MbeA and accessory protein MbeC of the conjugally mobilizable plasmid ColE1. *FEBS Letters* 586(6): 675-679. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.01.060
  
- ◆ VILLEGAS-TORRES M. F.; BEDOYA-REINA O.C.; SALAZAR C.; VIVES-FLOREZ M.J.; DUSSAN J. (2011). Horizontal *arsC* gene transfer among microorganisms isolated from arsenic polluted soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65(1): 147-152. DOI: 10.1016/j.ibiod.2010.10.007
  
- ◆ VISCA P., VALENTI P., ORSI N. (1986). Characterization of plasmids in *Thiobacillus ferrooxidans* strains. In *Fundamental and Applied Biohydrometallurgy*, edited by Lawrence R. W., Branion R. M. P. and Ebner H. G, (Elsevier, Amsterdam). pp. 429-441.
  
- ◆ VORONTSOV I.I.; MINASOV G.; BRUNZELLE J.S.; SHUVALOVA L.; KIRYUKHINA O.; COLLART F.R.; ANDERSON W.F. (2007). Crystal structure of an apo form of *Shigella flexneri* ArsH protein with an NADPH-dependent FMN reductase activity. *Protein Science*. 16 (11):2483–2490. DOI: 10.1110/ps.073029607
  
- ◆ WAKSMAN S.A.; JOFFE J.S. (1922). Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil: II. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism isolated from the soil. *Journal of Bacteriology*, 7(2), 239-256. PMID: 16558952
  
- ◆ WANG G.; KENNEDY S. P.; FASILUDEEN S.; RENSING C.; DASSARMA S. (2004). Arsenic resistance in *Halobacterium* sp. strain NRC-1 examined by using an improved gene knockout system. *Journal of Bacteriology* 186(10):3187-3194; DOI: 10.1128/JB.186.10.3187-3194.2004
  
- ◆ WANG X.; LORD D.M.; HONG S.H.; PETI W.; BENEDIK M.J.; PAGE R.; WOOD T.K. (2013). Type II toxin/antitoxin MqsR/MqsA controls type V toxin/antitoxin GhoT/GhoS. *Environmental Microbiology* 15(6):1734-1744. DOI: 10.1111/1462-2920.12063.
  
- ◆ WEN Y.; BEHIELS E.; DEVREESE B. (2014). Toxin–Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. *Pathogens and Disease* 70: 240–249. DOI: 10.1111/2049-632X.12145

- ◆ WICK R. R.; JUDD L. M.; GORRIE C. L.; HOLT K. E. (2017). Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLoS computational biology 13(6): e1005595. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005595
  
- ◆ WILLIAMS K. P.; KELLY D. P. (2013). Proposal for a new class within the phylum Proteobacteria, Acidithiobacillia classis nov., with the type order Acidithiobacillales, and emended description of the class Gammaproteobacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63: 2901–2906. DOI: 10.1099/ijs.0.049270-0.
  
- ◆ WISNIEWSKI-DYÉ F.; VIAL L. (2008). Phase and antigenic variation mediated by genome modifications. Antonie Van Leeuwenhoek, 94(4), 493-515. DOI: 10.1007/s10482-008-9267-6
  
- ◆ WORLEY J.; MENG J.; ALLARD M.W.; BROWN E.W.; TIMME R.E. (2018). *Salmonella enterica* phylogeny based on whole-genome sequencing reveals two new clades and novel patterns of horizontally acquired genetic elements. MBio 9(6): e02303-18. DOI: 10.1128/mBio.02303-18.
  
- ◆ WU J.; ROSEN B.P. (1991). The ArsR protein is a *trans*-acting regulatory protein. Mol. Microbiol. 5 (6): 1331-1336. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb00779.x
  
- ◆ WU J.; ROSEN B.P. (1993). Metalloregulated expression of the *ars* operon. J. Biol. Chem. 268 (1): 52-58. PMID:8416957
  
- ◆ XU C.; SHI W.; ROSEN B.P. (1996). The chromosomal *arsR* gene of *Escherichia coli* encodes a trans-acting metalloregulatory protein. Journal of Biological Chemistry 271 (5): 2427-2432. DOI: 10.1074/jbc.271.5.2427
  
- ◆ XU J.; ZHANG N.; CAO M.; REN S.; ZENG T.; QIN M.; ... BEI W. (2018). Identification of Three Type II Toxin-Antitoxin Systems in *Streptococcus suis* Serotype 2. Toxins 10(11): 467. DOI: 10.3390/toxins10110467
  
- ◆ YAN L.; YIN H.; ZHANG S.; LENG F.; NAN W.; LI H. (2010). Biosorption of inorganic and organic arsenic from aqueous solution by *Acidithiobacillus ferrooxidans* BY-3. Journal of Hazardous Materials 178(1-3): 209-217. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.01.065
  
- ◆ YAN L.; HU H.; ZHANG S.; CHEN P.; WANG W.; LI H. (2017). Arsenic tolerance and bioleaching from realgar based on response surface methodology by *Acidithiobacillus ferrooxidans* isolated from Wudalianchi volcanic lake, northeast China. Electron J Biotechnol 25:50–57. DOI: 10.1016/j.ejbt.2016.11.007

- ◆ YANG H.C.; FU H.L.; LIN Y.F.; ROSEN B.P. (2012). Pathways of arsenic uptake and efflux. *Curr. Top. Membr.* 69: 325–358. DOI: 10.1016/B978-0-12-394390-3.00012-4
- ◆ YE J.; YANG H.C.; ROSEN B.P.; BHATTACHARJEE H. (2007). Crystal structure of the flavoprotein ArsH from *Sinorhizobium meliloti*. *FEBS Letters* 581 (21): 3996–4000. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.07.039
- ◆ YOU X.Y.; GUO X.; ZHENG H.J.; ZHANG M.J.; LIU L.J.; ZHU Y.Q.; ZHU B.; WANG S.Y.; ZHAO G.P.; POETSCH A.; JIANG C. Y.; LIU S.J. (2011). Unraveling the *Acidithiobacillus caldus* complete genome and its central metabolisms for carbon assimilation. *Journal of Genetics and Genomics* 38(6): 243-252. DOI: 10.1016/j.jgg.2011.04.006
- ◆ ZERBINO D.R.; BIRNEY E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research* 18(5): 821-829. DOI: 10.1101/gr.074492.107
- ◆ ZERBINO D.R. (2010). Using the Velvet de novo Assembler for Short-Read Sequencing Technologies. In *Current Protocols in Bioinformatics*, A.D. Baxevanis, D.B. Davison, R.D.M. Page, G.A. Petsko, L.D. Stein, and G.D. Stormo, eds. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley y Sons, Inc.).
- ◆ ZHANG S.; YAN L.; XING W.; CHEN P.; ZHANG Y.; WANG W. (2018). *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its potential application. *Extremophiles* 22(4): 563-579. DOI: 10.1007/s00792-018-1024-9
- ◆ ZHANG Y.; ZHANG S.; ZHAO D.; NI Y.; WANG W.; YAN L. (2020). Complete Genome Sequence of *Acidithiobacillus ferrooxidans* YNTRS-40, a Strain of the Ferrous Iron- and Sulfur-Oxidizing Acidophile. *Microorganisms* 8 (2). DOI: 10.3390/microorganisms8010002
- ◆ ZHU Y.G.; YOSHINAGA M.; ZHAO F.J.; ROSEN B.P. (2014). Earth abides arsenic biotransformations. *Annu. Rev. Earth Planet Sci.* 42: 443–467. DOI: 10.1146/annurev-earth-060313-054942
- ◆ ZOU K.; GUO X.; LIANG Y.L.; ZHANG X.; MA L.Y.; QIU G.Z.; YIN H.; LIU X.D. (2015). Physiological and Genetic Characteristics of Psychrotolerant Acidophile *Acidithiobacillus ferrivorans* ZB-1 and DX-1. In *Advanced Materials Research* 1130: 71-74. Trans Tech Publications. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.1130.71
- ◆ ZOU Z., QIN H., BRENNER A. E., RAGHAVAN R., MILLAR J. A., GU Q., ... & MERRITT J. (2018). LytTR Regulatory Systems: A potential new class of prokaryotic sensory system. *PLoS genetics*, 14(10), e1007709. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007709

## 10. ANEXOS

### 10.1 Anexo 1

#### Secuencia del plásmido pAfPQ510-1

>pAfPQ510-1

GCGCGGGTCTCTCACGGATCAGATTACGCTCGAATTCGGCCAGGGCGGCGAAGACATGA  
AACACCAGACGACCGGTGGCGCTCACC GTTTCAATCTTCTCCGTGATGCTTTCAAAGCCG  
ATTCCCCGGCTTTCCAGCTCTCCGACGATGCGCACCAGATCGGGCAAGCTACGGCCCAGG  
CGATCGAGGCGCCAGACTACCAGTACATCGTCCTCCCGCAGGGAGCGCAGGCATTGAGTC  
AGCCCCGGCCGATCTGCCTGTTTGCCGCTGATCTTTTCTCGTAAATATCCCGGCACTCT  
GCCTTTTCCAAAGCATCGCGCTGCAGGTCCAGATGCTGGTCGTCGGTGGAGACGCGGGCA  
TAGCCAATCTTTGTGGGCGCGATATTTTGTGTGTCAGTCATGATCCACACACAGATTGAT  
AAATGAGTTAAACGACACTTTAGGCGTAGAAACAGCGATCGGCAAGCCTGATTTTACAGG  
GCCTGCCGAAAGTGTCGATTAAACCTTCGTTTTATGGAATCCGGCTATATTTAGGCACAA  
GTTTCTCATATTTGTGATGGCATCTCCCGAAAAGTTATGTACTTATGTGCTATGAAGCTG  
GTGAAGACCGGGATGGATATACCCACCGCAGACGCGATCGCTTTATCGAACTCTTGAATG  
CCCATGGCGGGCAGCAAATGGTAGGCCAGCACCATGCTGACAATCCAGGTTTGTGCAAAA  
GCAAATACATTGACTAAGGCGAATAAAGCCGCAGATTTTGCTGTTGAGTGGGACGATATT  
TGGAATACAAAAAGCTTGCCAGGATGAAGGCTGTGACCATAACGGTGAGATAAGCCAAG  
GTCACCGCAGCCGAAAAGCCCACGAAGGTGTTATAAAAAAACCGGCTGCCAAAGTTGATC  
GCAGCTGCAAATCCACCGGTGAGTATGAAAACCATAAATTGACGGGAAAAAAGATGCGC  
ATAGCTCAGTCCCTACAGCATTTTGGCAATCTGTCCGGCCATCTGGACACTCTCGGATAT  
GCCCCGATCCTCTGGATAGTAGTAGGATGTGTCCGCGACATACAGCCCTTCTATGGATAG  
CTTAATAGGTGGCAAGGTATCCAGATAGCCAGGGCCGAGATGGGTTGGGCATAGCGATA  
GCGGTTGGCGTACATGGCCAAGATGTCACAGTCTTCAGATCGGGATTGATGGTTTGTAG  
ATAGTGGCGCACCTTGCTCAAGAATGCTTGGTCAGGATCCTGATACTTCGGATGCTCACC  
GGGCATATAGAATGGCACATAAGTGACATGCCCTGACAATTCGCGGAGATTGGTAAATTC  
CACCAGCCCCGGTATATCCATCTGGGGGTGCTTGACGTTGAGCCAGAAGTTTTTGGTGAT  
GGGCTTGGTGTTTTTACGATCACGCAGACTACGGCGATATTCTTGAGCGCACGGTATTG  
ATTGAGCAAAGGCTCTGGAAGGTCGGGGATCAATCTGGGGACGAAGGGCACCGGCACAGT  
GCTCACGACAGCGTCGAAGTGAATTGGCTGCCAGCCACCTGTACCCCGGTGACCTTGCC  
ATGCTCATGCAAAACGCGCTCGACTGGAGTGCCTAAGCGAATAGCGCCTCCGGATTGTTT  
GATGACCTCCCGTAGAGCATTCAACAGGGTCTCCGAGCCGCCTTCCAAATAGCCGAGCTT  
CTCTCGCATCATACTGTAGCGTGAAGACCCGATACGCTTGATGCGTGTCCATATCCAGGC  
GGCGGATAGTGTATCGGCATAATCATAGAACTTGAGGTCAAAGAGGCGGCGCCAGAGGAC  
GTCAAAGGCCTGCGTGCCGACCCACTTGCGGATCCATTGGGTAGCTTCTAGATGATCCAA  
TGGGCGCCAGTCTTGCGCTTGGTGGACAGGAAAGCATGCGCCCCATAGCGGATCTTGCT  
GATCAATCCGAGACCAGGAACTTTAGCAAAGCGATGGGGTTTCCCCAGGGGTGCACGTC  
GCCCTGGTAATAATATCCCATGCGCGTTTTCTTTCCAGCGCAGCCTGTCTCGAATGCCAG  
CTCGTCCAGCAAGGTAAATAAGGGTTGGTCAGACGTGCAGATGAAGTGGTAGAAGCGCTC  
AATGGACAGGCCATCAAAGTCAAAGGCGGCGGACATTCCGCCGATGCGGTCATCCGCCTC  
GAAGACGGTGACCTGATGACCGTCCTTGCGGGCTTGGTAGGCCACAGCCAATCCCATGGG  
ACCCGCGCCGATCACTGCTACCGATTTTGGATTCTGTCATAGATTGCCTAGAACTCCAGTT  
CGATCTTGCTGTAGGTTGGGTCGAGAAAGGTTTCCCGGATGGCGGTCGCAAAGGGCGTCG  
CTTTTACGCCAAAAATCCCCGGCCAGTCGATCACCTCGAACACGTCCGGGGTCACCAAGG  
CCTTGAGTTGGGTCACAGTGAAGGGAGGGTTATTATCGAAAACAGCCCATGTGCGTAAAA  
GTGCCGCAAAGAGCCAGTAAGGGATGTGTATGATCATGGTCTTCGCGCCAACGGCTTTGC  
GGATGGTACGGATGATATCGATGTAGTCGATCTTCTCCATGCCCGTAATGTGGTAGACGC  
CACCAATCCGGCGGTGCTCGATACAGCTAACGATGATGTGCGAAAAGTCGCCTACATATA  
GCGGTTGCCGCGAGATACTTTCCGTCACCGGGAATGGGGAATATGGGGACCCGCTTCATGA  
AACGAGACAGCCACCCAGATGCTTGCGATCGAACCAACCGAACATCAGGGTTCGGTCTCA

GTACGACATTGTCCACACCGCTCGCCAGGACCATATCCTCCTGCTCTTTCTTTGTCTGGG  
TGTAATCGTCATCGGCCTTGGATTCCAGGACGGAAGAACTGATATGGACGATATAAGGCA  
CCTGATACTTTTTTATCGCCGCCAGCACATAACCGAGTGGATGTCACCGTATTCCTGACAT  
AGGTTTCCCGTTCTTTGGCCCCGATCTGCGCCTGCAGCATGCCACGGTATCCACCCCT  
CAAAGTGCTTGGACCAAGGTCCAGGCGTGGCGAGATCAGCCACTCCGCCGTGATGTCGG  
GGTGCATTTTCTGCAAAACACCTAGGTTATGTCTATGCTTATCGAGCACCACGATGTTGG  
TGTAGCCCTTGGCCTTAAGTCGGGGGATAAGGTTCTGACCGACGAGGCCTGCCCCACCGG  
GGAGGATTATTTTGTGATTTTCTTATCTATTGGATTTCATAGATTTCTTATTAATCTCT  
AGTGAATATACGTTTTTGGTATGGACATGCATCAAATTATTCATATTATTTGAGCTGATT  
GAGCATAGATTTTATACGCTGGTTGAAAAGGACGTAGATGGACAGCATCAGCATCAGTAGA  
CGGAACACTAATTATCGCCCATGAAGAAGTGCCGCATATGAAGCAGAGGACTTCAGGGG  
AAACGCCTTCTGCAAATCCGGTCGTGCAAAGTAAATTTTCGGACAACATCCCAAGCTTT  
CGTATATACGCTGTTATTTTCTATTTGAGTTGTGAGTATAGAAGGCGATGGCAATTGTGC  
AACTTTCCAACGGTACGGAGGATTGGTTGCTAAGAATCTTGTTTCGAACGCTTTTGAATA  
GTCTAACGAGTGGCTCGCTGTTGTCAGCTTAAAGGCAGATATCCTTTGGAGTCCCGTAGC  
ATTTTTTGCAAATAGTCTATTTGCGTCATGCTGTCCATTAATGAAGTATTTACAAACAA  
ACCATCATCACCTAGCGGATAAAATAAATCGATATGGGCCTTTGATTGCGCCATCAGATAG  
CCTGAATAGAATATGGATCTGATTTGGCTTGTATAACATATTTATTATGTGGCCAGTTAC  
GGTGGTATGCACCCCAATATTGACATAGCTAGAATGCTCTGGCACTGACATCCATTGATT  
AAAATGACTATTTAACTTTCCATTGACCGTGGTCAATTTTGGTTTCACGCACTGGCTACG  
GGTAAGAACAGTGTAAGGATTGCCGGCATACTGTGTCTTATAGCATGTCAGAAGCGCTCT  
GAATGTTGCTGGTTCATCAAATATCGGGTATCTACCATCAATGCTTGCGAATGTATATAT  
AACTTTATCTGCACTTTTCTCTTCATAGGTTTGTCTGTGCGTTGAGATGATCTAAATATGG  
TGTGTATACCGAGTACGCTTGGAAGACCGGGCTCGCAACAAGATCCATATGGTAGCCCTG  
GGCCATCATGAGATTCCAAGGGATAATGTTAACTGAATGATTCTTTACGGCACTCAGCAG  
TGCCGGATTGAGATGAACTGACTCGCTATTGCGCTTGTTTTCTCATGTTGTTGCGCCTC  
TCTATGTGCTTTTCGAGGAAATCAAGGATACAAAATTCTTATAATTATCTATCTCATTAA  
GGAAAACATGGATGCGCCGGGCAGTGCGAACGTTAGAGCTAAAAGATATATACTTGCGAC  
ATTGATAGCGGTACTTCTTAGCGGCTCCTCGGAGAAAAGTACCAAGCCTACGGCAGCTAC  
AAGCAGCACGGTTCCAAAAACGCCATGGCATGCCCCCACCGAATCCAGGGTCATGCCG  
AGTAAATCCTTCTTTCCATGCCCAAATACCATACGCCGAGAATTAGACTCTGAGCCAG  
ACGAGTACGCTCTTTTTTAAAAAGAAGCATGGATGTGGCGATGATGAACAAGAACAAAAT  
GATTAACGCGGCTACGGTTTGGAGACCCTTACCATGGATCGACATGGCAGGTGTGTATCC  
ACTAGCGATAGCCAATGTTCTTGGACATATGCCGGAAGGTGGACGATATCCTGCCCAGC  
GAGTGCCCATAGCGCGCAAAATGAGATTACAAAGCTGAGCAACGGAAGCAGTGATCGAAC  
GAGCTTTTGCTTCTGTGGTTGGGCATACCACCATAGAAGCGGATAAACACACAATATAAA  
AAAGGCAATAATGAGAGAGGTGGACTTGACCAAAGACCCAAACGCAAGAAGGATACCAGC  
AACCAGCAAGGAAATGGTGGCTATTTTTTTTACTTTTGTCTCCGAGAGCAAGTATCAACAG  
TAATATTCCGATGAAAGCAAACCTGAGTCGCCAAATCCACCAAAGCAGCACCGATCAGCCA  
AGCAATTACCACAGGAAGAGCGAAGCGAGGAAATACTTTTGTCTCGGGCTGGATGCGGGA  
AAGAATCAGAGCAAAGCCCAAACCAAAGGTGATCCAACCTTGCCAACCTAATTAGGGCAGC  
CATGCCCCATAACATATGATCTGGGTAGAAGTATGGGTTTGCCAGAGAACCAAGTGGGCC  
GTAGGTGAAGAGAATGGATTGACCCCATTCAGATGATGCTGCAAGCCATAACCTAACAT  
CCATGCCCAGGATACGTCTAAAGTGTCCTCTGAGGGGCGAAGGACTCCATAAGCCAAGG  
CATTGTAAAGGCAAGAATAATGGCAAATATGCCATAATAAAATAGCGTTTCTGCTCGCGT  
TGTCTGGCGCGGTATATATTCTTTAAACCGGTTGGGTTCCACATGGTATTTTCTTAGAG  
TTTTGGTTGCGTCGTTATAGTTTCATTTTTTTGAACAAGCGCTCCGGTATCAGCCGAATG  
CCTACCATGATGAATTTCCAGAACCATGGCAGATAGATTACGCCACTTTTCTTTGAATG  
GCCCAGTAGATACCCTTGCCAACCTGTTCCGGTGAGGCCCATAGCAGCCCTTGCGAAAAG  
CCCGCTGTCATGGGGGTATCCACGAAGCCGGGCTTGATGGTGATGACCGTCACGCCAGAC  
CGGTAGAGGCGGTTTCTGAGGCCCTTGACAGGAAGTTCGAGACGGCGGCCCTTGGCAGTCCCA  
TAGACGTAGTTGCTTTGCCTACCCCGATCACCAGCGACAGAGGATATGACGACTATGGTG  
CCGCGCTTCTGTCCCTCAAAACGATTGGCCACATGGGTGAGCAGCGAAATGACACTGAGA  
CAGTTGGTTTGTAAATTCCTTCAGTGTTTCATCGAATGACTCCTCACAAGCCTTTTGATCG  
GAGAGTGTCCGTGAGCGATGAGGATGGTGTCCAGCTCTCCTATCGTGGTCTCTGCCTGA  
CTAATCAGATCCGCATGCTTGGCCGTATCGTTAACGTCCAGAACCATAGTCTCTACCTGG

GTAGCACCACGGGTTTTTCAGATCGCTGGCCATCGCAGCCAACCGATCCTGATTACGTGCC  
ACAAGGTAAAGGCGATCCCCATCATGTGCAAAACGCCGGGCTGTAGCTTCGGCGATGGCT  
GACGTTGCCCCGATAATTAATATATGACGCATTCTTATGTCCTCATCACGCGTCGCCAAA  
AAGATGACGAGAAGCGTGGGTGATATAGCGCTGAAACTCCTCCCAGCGGGGAAAATATT  
GCCGAAAATGGTCCCCAGACATCCTGGCATCCTTGGCTGGGTATACTGCCCCACCAGAAG  
ACGCGACGATCTTATCCAGGTTGTTTCAGCAAGTCCATGGTGCGTTGTCTTGATTGGGGA  
AATCCAGAGCCAGGGTTGCGCCCGGTCTAGGGAAAGAGAGAAGCCCAGGCGAGCGCCGAT  
CTCCAAACACTTTGAGTACGGCTAGAAATGATCCGTTTTTTTGGCGCAGCGATTGTCTCCA  
GCAGGGCGCGTATAGATTCTCAGCTGAGCCCCGAGGAACGACGCATTGATACTGGAGAA  
AACCCTGACGACCATAACATCCGGTTCCAGTGAAGTATGCCGTCCAAGGGATAGAAAAATG  
GCTCGTAGTGGGTAATGGCCCGGTGCATCGCGGCCATCTGCTTGCGATAATAGAGCGTGT  
TGAAGGCTCTCAGGGACCAAGCGTTTACCAGCGGAAACGGTGGCTCTATTGAAAGGTAT  
GCGTTTTTCCCGGGCGGGGAAGGCGGCCTCTTTTGGCGAGCTGCGTGATTCCCCCGCATGA  
AGAAACCGCGCCCCAAAGATTTTTCCACGGGCCAGGCAGTCGATCCAAGCCACAGTATATT  
CGTAATCCCGATCCGATTCTTCCGACAAATCAAAAAGGCCCTCCAGGTTTGCAAACCGGA  
TCGTCTCGGAATCACCCCTGGATTGGCTATGGGCCGGAGCTGGATCTCTGCCACAAGA  
TGGCACCAGGTCAAACCCAGACCACCAATGGTGGCATGAAAGAGTTCTGCATTTTCCGTAG  
GTGAGCACAGCACAACACCCTGATCCGACCGTCGCAGTGCTAAACACAAAACATGCTGCC  
CGAAGGTGCCAGTACGGTGATGGTTCTTGCCATGCACGTCGTTGGCTATAGCGCCACCCA  
CGGTTACAAAACGGGTGCCAGGAGTCACGGGGAGAAACCACCCAATAGGCACAACCAGTG  
ATAGAATATCAGCCAGCAAAACCCCTGCTTCACAACGCAGAGTGCCCGTCGAGCGATCAA  
TGTTTCAGCACTCGGTCAAGGCCGCGCATGTCCAGCAGCGACCCCCATCATTTCAAGCAGC  
TATCCCCATAACTGCGACCATTACCATAACGGCAGCACGGAATGGGAACCGCCAGGCAGAT  
CCTCATCTGTCCAATGAGCGCGATAGACGGCTGCAGGCGTTGCCTTGGGGTAACGGCCCC  
AGGACGCGTAGATCACCGTCATATGGCTGCGAGCCAGAGGAGTCCACCGATGACCGCCGC  
CACAGCCCAACTACCCTTGTCTTTCGCCGCAAACACCACGGGATCATCGTGCATTCCGCC  
GCGATGGGCAATCAACCAAATACGGCTGATCCAGTAAAGCAGTATGGGACTTACCAGCCA  
CAAGAATGCCGGATGCTGATATAGAACTTTCACTTTGTCACTGTTGATATAGAGCGCAGA  
AACCAAGACCGCCATAAAGCCACAGGCCACGCCGAAACCCATCAGCATCACGAGGTCTTC  
CACATGATAGCCACGACCATGGGTGGTCAACTGACCGCGTTGTTTAAGGGCCAGCAGTTC  
AGAATAGCGCTTGATCAGTGCCAAGCTAAAGAACAGGAAGATGGAAAACGTTAGGAGCCA  
GAATGACGGCCCTATTTGTGTTGCCGCCATGCCCCGATGATGCGAATGGTATAGAGGCC  
TGCAAGCAATAGGGCATCGAGCAGCACGACGGCCTTGAGCCAGAAGGAATAGCTGACGGT  
GAGAAGATAATAAACCACCAGCACGATCACAAAATCGGTGGGCAGCCACAAGGCGGCAAT  
GGTAAAGGCGGCAAGCAGTAACGAGGGGATAAGGACGATCCCCTGGACCATGGATAGAGC  
TCCTGACGCAAAAGGTGCAAGCCGCTTGCGCGGATGTAGCCGATCCGCCGACAGGTCTAG  
GAGATCATTGAGCAGATAGACGCTGGAGGCACAAAGAGAAAAACTGATGAACGCCAATAA  
TCCATTCGCCCATAAACTGACATGACTGATCTGGTGGGCCAGCAGCATGGGAATAAAGAC  
CAGGATATTTTTTCAGCCATTGGTGACACGTAATGCTTTTCGCGTAGGTTTTTAGGCTCGG  
GTGACGATCGGTGAAGGTTTGGGAGATGGGGCACTGATTCTGGCGCCTTGAAGAACCCC  
CCGGCCTGGATTACACAGATAGCCTGGCGAGCCATCCCCAGACAGGCACGTCTGCTCG  
ACTATTGCCTGCATAGTCAAAACCTTTTATGCCATAGTGTTTAACGAGAATATCTCTTTT  
TGCTCGACCAGCAAGGTTGGTGCCATCTTCTGTGGCATGCATTTGGTGAAAACCTCCAG  
GTGCTTTGCTATGCCATCTGCAAACTTGCGGTGTGATGCTGTTGCTAAAATCAAAGGTGCG  
GCCAGCTGCATGTTCTTTCCGTAAAACTCTACAAACCCAGATTGATAGGGTAGTGTTTG  
GACATTCAGGTCAACGCGGCTTGCGATTTTCATCCTTGAGCACAGATTTTCCACGCAACAA  
CCAACTGGAATAACAAAAACCAACCACGGTTTTTGTGTTGATGAGGATGAGAAGGGACTC  
TACCAGTAAATCAGTACGGATCAATGTACCGTCAAGGTCTACACACAGCGGGATTTTATC  
GTCTTCCAATGGGCACCGTGTTTTGCGTTATAAAGATTGATTATTATGTGCGGCGAGAAC  
TTAAGACAATTTGCATCATTCTGTCTCGTGGCACTCTTCCCGTCTACTGCTAATGTACTG  
ATTCTCCTGCTACCGGGCAAGGGCCGAAAGGGTTATTATGAGACATTACGATTACGGTG  
GAGATTTTGGACGATGGCGGACGTGAAAACAGGGCGGAAACGGGAGGTGGTGATCGAGGC  
GGAGGCTCCGATTCCGGTGGTGCTGGGCAGGGGGAATTGTTCCGGGGGGATGCCAGCGGA  
AGCGGTACAGTGACGGCTGCGGCACCCGATCCGGTCGAGTCAGTAGCCGCTGTGCCGCC  
CCCTGATTTGCTGCCCCGAGGGCTATCGCCTGTAGGGTCGCCGTCCGCAGGACAGGATCT  
GTTGCCTGTGCTGTAGCCACCCCTAAAAAGCGTCAGAGAGCCCCTGAAGGGGAAAGGAA

ACATCTCACCCCTCCTGGAGGTGGATCGCCTGCTGGCGGCCACGAAAGACAATCCCCGGAC  
CGGCCTGCGCGACCGCTGTTTGATCCTCCTGATGTTCCGTCACGGAAGTGCAGGACGACGGA  
GGCCTGCGCCATGCGGATGGACCAGGTGGATCTGGAGAGCAAGATTCTCCAGGTGCAGCG  
CCTCAAGGGCGGGCTGTCCACGACGCAGCCCTTACGGACGGAGGAGATCCGCCTGCTGAA  
AAGCTGGATGGCCGAGCGGGAGCGCTGGCTGCGGCAGTGGCGCAGGAAAGAAGGGGGCAC  
CGGGGCGGCCCTGGATCGCCAGGCGCTGTTTTTGGAGCACGCGGGGGACGGCGTTGTTCGCG  
CAAAACCTTCTGGGCGCTGCTGCGCCGCTATGGGGAGCTGGCGGGGCTGGCCCTGCCACC  
CCATCCCCACATGCTCCGCCATGCCTGCGGCTTCGCCCTGGCCGACCAGGGGGGCCGACAC  
CCGGCTCATCCAGGACTATCTGGGGCACCGGAACATCCAGCATAACGGTGCCTATACGGC  
CACCAATCCCGTGCCTTCGAGAACTGTGGCGGTGATAGCCATTTGGAGCTATAACACT  
GACGACAACACTAAAGTACAGGTGCGTACATGGCTAAGGTCAACATATCAGAAGCTGCAA  
GGATGGTCGGCAAGAGTCGATCACATCTTTACGAAAAGTACATAAATACTGGTGCATGA  
CAGTAGAAACGGACCGTGAAGGGCGAAAGGTTATTGATACTTCAGAGCTGATAAGAGTCT  
TCGGAGACCTAGTTTATGGCGGCAACACCAAGGACATAACAGAGGACAGTATAGGACATG  
AAAAAACAGCCAAAAAGACAGTGTAATTAGCGCGTTGCAGTCTGAAAATGAAGTGTTCG  
GTGAATACCTTAGGGCCAAAGAACAGGAAGTGGCTTGGCTACGTGAGCAGGTTCGGCAAAA  
CTACAGCATTGCTAACTCACCAGAAGGATAGCCCTGGAATGGCGCAAGGAAAGCGTTGGT  
GGGGTCCCTTGAGAAAACGGAATTTAAAGCACGTTAGGCTCTAGTGAGTACCTGCAACC  
ACCTATATTTGCTGGCTGTGTACATGGTCTCCCTGGCAATAGCCGTTACGGGGTGTCTC  
GATCCCAACATCGCAGCTTTACGCCGCGACAACCACGACCGAAAACGGTGTCCGAATGAT  
GGCATGTGTCCAGAACACCGTTTTTCATTGCTTTCGTACACGGTTTTTAACCTCCCATCCGAA  
ATGGAGCCGTTTTCGGACAGTTTCACGCTGAACACGCTCTCTGGGCGCTAACGTGCTTTAA  
ATTCCGAATTCTGAGGGGACCCCGGCTTCTGCCAGCGATTTGCGAACATCGAGCAGGGAT  
GCCTCCTTTGATCTCAAACCGAGTTCACGGGCAAGGCCGGTGAGGGCTTCTCCCGTCGGA  
TCGCCGATTGCCGCAAGACGGCCCGGGCGTTTTTCGTAGGCGAGGCGATCCATGCTTCCC  
GGGATTTCCGTGCGCACATTTCGACCGCTTGGGGAGATGACAATCTCTGACCGGCCCAACG  
GATTTCCAGTCTGTGCGCATGGTTTTTCATAACGGAATTGATGGCGCTCACGAGATTTTGC  
GCGTAACCGGCAGAAATCTCTTCCGCGTCTACTTTATCGGCGAGATATTTACCGTACTCA  
ATCACGACTCGCGGGTTATTCTTTTCGAGGCGTCCGATGCCATTCTCTGTATGGTATTTT  
ATGTATCGTGAAAATCTAGACCAGCGCTGCGCGAGGTCACCAAATGAAGTGGCGCCAATA  
TCTTTATTTTTTAAAAGATTGCTTTAAAAAAGCCTTTCCGGCGATATAAATATCGCGATGG  
CCAATACCGTAATTCCGTGACATAGAAATCCTCATAAATAGGTGTGAAATGGACAACATA  
CTGCCCTCCCCACGGAGGGGATAAAAAACAAAAACATTTTTTTCTTTGCGCACTGGAACAAT  
GTGCAAAGAAAAAAGGCCGCCACGGGCGATACCGCAGCGGACGTCGAGGATTTCTGGCTC  
CTATACAAAAGCTTTTGGCGTAAATAACGTGTTGTGTAGATGCGTGTCCCCCGCTGTTCG  
GGTCCGAGAGGCTCGGGAAGAGGACATCGCCTGCCGGCGATGGGTGAACAACAAGGGACG  
ACCCCAAACCGAGCCATAACGGACCGGTGAATTTTTCTTGTGTGTTCTGATGACACACGCA  
CGCGACGAGCTTCGCGGCAAGCGTTTTGGGGGACAGTATCTTATCCAGCGCGACTGCGACG  
CGCTCATCTTGTTACAGGCAAAACACATCAACTACGGAGTGCGGGCCAGGCATACGCACAT  
CCTCAGTTGGGATGTGCGTCTCCATCTTCGCTGACGTGATTGGGGGGGCACGCCCGGCCG  
GTTTCACGCACTTTCACGCGCCAAAATAGGCTGTAAAGCGAGCAACGGCGGGGCTGCAG  
CCGTCCGTCTCTGTGCTAGCGCAACAGAGACGGACGGGGGTGGCTGCGATAGTTTGCAGT  
GGAACATCCGCTCCAGCTGCGCGGTGCTTTGGCGATCGACAGCATCGAAAGGCTGCGG  
GCGTCTGGAGGTATGGTGAGAATCATCCATCGCTGTTTCGTGACGCGCCGATATATTGCG  
ATTATCCCGTGGGGTCGCTATCAGTGCGCAGTCTACAGGCAATAGAAATCACGCATGCCT  
CTGCGTATACAGAGGCGCTCAGGTTTGGTCCCGATTGGGACTATTGCGTGCCTCGTTGCC  
GGTGAGCTATTTTCATCTGATAACAGATGATGGCGATTGAAGTTGTTAGACTACCGCGCC  
GCCCCGAACCGGTCAAGCTGCAGGCTTGAGTTTCTGGACGCTGAGAGGTAGTTGGTTGA  
TAGATGCTTTTCATGGCCGAATCCGGCCCTAAAAACGTACAGAAACGAGGTATCTATCAAA  
TGTTTCATCTTCTCTACGCTTATCGTCCTCTCCTTGTTAGGCGATAGCTTAATTTTTTGT  
TCAAAATCCGGGGTCCACTATAGGATCGGGAGGACTGGTTCCAGCGCAAGATCGACCAACT  
GCAACCACCATCCCTAGCAGGGCCGGAAGTACAGAGAAAGTATGATGACCATTAGAACT  
TTCCGCTATCGTTACATAACATTCCTATGGAATAATCAATAGTTATTGATGATTCCTAA  
GTTCTTTAGCCTATACCCCATGCTTGACTAGAAACGCCGAATTTTTTCTGCAATTTTATC  
AATAAAAATTTTCATCGGTATCCATCCTCACTTGTCTCATTTTTTGTACTTGTCAATGGT  
TTTTTGACCCTCAGTGAGAATAAGCTGCTTTGGCATGAGCAGCTGAGCAGCAAAGCTGTT



TGCTTCGGACTCGTATGGGTCCCAATATGACTCAGTTCTACTCATGGTCTTTTGTGAGTC  
TATAAATCCCTTCTTTGATTTGGCACTATGTAGACAGTAATGCCCAATCTCGTGTGCAAG  
CGTAAACCTCATTCTTGGTGGATAATCATTTTTTAATTGGGTTTATTTTACAATAGGATT  
TCCATCTTCAAATAGTATTTTACCAACTATACCTCTTTCATCTAGAGAAACGTCTTCTTC  
AACACGATTCCAAGATCTTTTACAATCTTGTCAAGATTAATTGGAGCCTCAATATTAAC  
CCCTAGACGATCTAGCAAATCTGAGGCGCTTGAGTACAACACTTCAGATTCGTTTCATGAT  
TCACCTCCATGATTTCCACGAGCTGAGAACCAATTCTTTGAGCAGCTTCAGCCTCTTTT  
GATGCTTGTTTGATGGCCGTTTCTGAATCAGCGATGCGTGACTTAATGAGTTCATCAACT  
TTCAACTCTAGCACGCCATTAACATGACGTATTACATCAGAGTTATCCAATATTGATGAA  
ACAAAATAAATTCCGATTTTTTCTCCGTGCTTAATTTTTCCCTTAAGTCATCAAATAAC  
TGAGATTCTTGCGAATGCTTGTGTGCTGAAAATTGTTGAGTAAATACATATCCTGCCATT  
GCTAATATTACAGTTACACCAATAAAAATAGCTGTTGTGAATACGATGTATGTGTTTGCT  
ATAGAAACAGCATCAGAAGGAGTATGAACATTGATAGAATTTATCCAACCTAAAATCCAA  
GGTGAAATCGCCCCCTCCGGCAAATCCTGCAAGAATAACTGCCAATGACTTATATGCTTTT  
TTTAACACTTTTTCTCCATACTGTAGGCACATATAGTATTATTCATGAACAAGTCTCAGG  
CTTCACATGAGTATCTCTGGCCATAAGAGGTTATGCATCATTTCTGTCTTTGGAGATCGCT  
GGCGACTTTGAACTGAACAGTGCGTTTAGTTGGGATATCAAGGCTTTCCCCAGTGGCCGG  
ATTGCGCCCGGTGCGTCCAGCCAGCTCCTTGAGGGAGGAGGTACCCAGTCTGGCAATTT  
AATGCCGTACCGTCGATCAGGGTCTGTGTGTCAGGGTGGCCATGGTGTTCCTCCGCGTATT  
TTTTGGGTTTCTGCTCGAAAACATAGGCGATACCGGTGCAAAGCGCAATGTGGGCGATTA  
ACAACGTGTACAGGAACTTCCCCGACAAACCGATCCGCGCTGCGACTTCCCGGAGCAGT  
CCCAGGGCAATGGCGTTTCCCTGCCCTCGCGGGCCTTCTGGCAGGCGATTGCCAGTTGT  
TCGATCAGGGCGGTATCACTAAGCTGGGATTTCATCACCTCGCCCCAGACCATGCCCCGG  
TCCCGCGCACGCTTCCACCGCATCCGTTCCGCACTGGTTCGTCGCCATGAAATCCCTCCCC  
CGCAATCGTCACTGTGACGAATCATAGGGCGGGCCCCATCGCTCCGTCAAACAATGCAGCG  
TGACGCCCTTACGCAGAAGCCACCGTAAAGGCCTCAAATTTGCCCTACAGCGCACGCAAA  
TGGCTCTGGCAAGGGAAATCTATTTTCGCGGCATCAAAAATCGATTCTGGGCCATTTCTCG  
ATACCCCTCCCCGTTGAATAAAAATAAAGGGGGAGCCGATGCCGCAGGCAGTGGGGGAC  
AACGTCCCCAGAGGGGGTTCGATCCGGCGAGCCGAAGGCTCGGACAGGGGGAGCGGCAGGC  
TCCCCGCCGGGGAGGTTTTCGCCCCGGCGCCGTAGGCGGCAAGCGGGCGCTCCTTCTTTCT  
TCCGCTGTGGGATTTTCCACCGCCGGAGGCGTTAAAGCTTTTCTTAAAGTTAAAAAACG  
CGCGCGCGCTTACGTTTTTTCGCAAGCCAGCGCCATTATTGGGTTTTTCGGTGGTTTTCCGGT  
GGGTGAAACACCGTGCCCTTCGGTGGGTGAAACACCGTGCCCATCCACAGGAAAAGGTGGG  
TGAAACACCGTGCCCATCCACAGGCACACCCCTTTTGAGTGGGTGAAACACCGTGCCCTTC  
GGTTGGTGAATCACGACAGTTCGGTGGCGGTGGGTGAAACACCGATAGAGGGCGTGTAC  
ACGCCCTCCGAATGACCGGCATCATGACCGGCCGACAATACCTGCCAGCAACTTCTTGGCG  
TCTCTGGTGTGGAAGGTCACGGTGTGCTTATCGTTGAGGACAAGGCGGTACTCGGGCAGG  
CTGTTGTGCGCCTCGATGGCACGCACGGCCCGCGAAACTCCTTGAGGGTGGATTTGCTA  
CCGGCCTTGGCCTGTAGCAGCTCAAGGCCGATCTTCCATTGCGCTTGGTGGCCGAGTGC  
TTGCGGGCTAGCTCGTAGAGCCGCCGCGCCATGGGCTTGCGTAGCCGAAATAGTCTGGG  
TGATGAGACAGGATCTCATACGCCTGGATGGCGTTGTAAAGCCATTTCGAGAGGGGTCACG  
TCAACGGCGATCATGCGCTCATCGCCTTTCGACTTCTCCACGATCCTGACGCGCTCAAGG  
ATGCCGAAGTTATCTGTACGCGCTGGCCGCCGCTCCTGATGTCTGTCTTGATGCGCGTG  
CCCGCCAGACGGTCAAATGACTCTTGCAAGCGGCGATAGTCGTCGCCGCCAACCCCTCGA  
TTGGTAGTCACCAAGTAGTCGTAGACCGTGAAGCGCACAGTGCGGTTTTTCGCGTCATCG  
CGGCCACGGTTTTCAGTCTTTCGGTTCATCTGCGATACCACATAGATCAACACGTCCTTGTGCG  
TGCTGCGTGGCGCGGCCGAGCACGGACGGCATGACCCGCACGGACTTGTTACCGTCGCGG  
CTCGTCCATTCCCAAATACTCAAGTCTGGCTTGGTCGCCAGAGTGAAGATCGGCGCCTCC  
ATACTCGCGCCATCATCCTTTCAGGGCGTAGTCGAACAGGTTCGGCCAGGAAGAAATCGCGG  
TTCGGATGGCGAATCTTGACCAGCCCGCCCATTGTCATGGTTATCGGTGCTCGGCGCGGCA  
GCGCGGGCCTCGGCGCGTTGCCGATCCTTGAGGGCCTTAACTTGATCCTCGATAGCCGCA  
TCTAGCCCGGCGCGCGGCGCCTGTAGCGCTGCCAGGTAGTCGCGCACAGCGCGAACCTCT  
GGACTATCGAGGTTGTCCGGCCTGGCGATGCGCGCCAACTCACGATTGGCCGCCACGATT  
CGCTCGGACAGTGTGCGGTGCGCGTTCGCGCAAGGCGTCCAGGCTATCAAGCGGGATATGC  
TCGGTTCGGCATGTCCAGTTTTTCGATTGCGTCTCCTCGAAAACGCCCAAGACCTCGGCG  
CGGTCTGGGCGATGGGCGCAGCATCCTCAAGCGACAATTCCGCTTGTCCGGCCTTCTCG

CCGCCTGGCTTGGCGCTGTTCCGCGCCCCGCACGGCCTGGCCCAAGCGGGCCAATGATGCG  
GCCAGAGCATCGTCCAGGTGCATGGGGCCGTCGTTTTTCTTTTTGGTGCCACCCATAGAC  
GCCTCAAATGCGCGAATGCGCTAATGTGCAAACTCAATTACTCATCTCTCCGGAAGCT  
GGGCGACGTACTCCGTTAGTAGCTCCTTGATGGTCTTGCCCTGCCTAGTTGCGTAGATTT  
TCAGCTTCGTATGCTGGTCGGCTGGAAGCTCGAAATTCACACGCTTCATGGCGGTATCGT  
CGGCCAGACTGGCGAGGGTTGCGGCCCGGCTCTTGGTAGCGCTCGGCCGCCCGGCGGTCA  
GAGTTACTTGTTTACTCATTGATGTAAATCCTCAAATGTTTAAATGAGTTTTTGTTCAG  
CTCGGCCGCGAGAGCGCGCACTTCCGCCGCCGCGTCGCCCGCCGGTTCCGTGTCCATAAC  
TGTCGTCCCCGCCGCGAGCGGTGCTGGGATAGCTCACGCGCTGCGTGATACGCGACTCCAA  
GACGGGTAGGCCATAGCCCCGCCAGGGCCTCGGCGACTTCCGAGCCGATGCGGGTCCCTTT  
GATCGCCCCGCGACACCACAAAAGCCGCTGTAGTTTTGCCGTCCGTGACCTCGATGCGCTG  
CTTCACCAGCTCCACCAGGTCAGCGGCCGCCCAAATGTCGTAGGGGCTTGGTTGAACAGG  
GATCAGTACGAACGAGGCGGCCTTGATAGCGGACACGGCTAGGTGCGCCGCTGGGGCGC  
TCCGTGCGATGACCACGAAATCCTTGCGAGCGATGTTCTTGATGTCCCGTTCGATGGTCGG  
CCGGTCGATGCCTACAACGTCAAGGGTTGATCCTCGCGCACAGCAGCCCAATCGCGGGC  
GCTGCCCTGCGGGTCAGAATCGACCAGCAAAACGTCTGCGCCCTCGATCTGCAAGGCGCG  
GGCAAGGTGGGTGGCGATGGTCGTCTTACCGGACCCGCTTCTGGTTCAATACGGCGAT  
GACGAGCATGCGCACTCCTTTGTGCAAATGATGTTGTACTCAACGCATCATACCGCAACA  
GGCTAATGAGTAAAGATGTTTCTGCACATTGCTTCACTGGTCGATGTCCGTGCCAAGGGC  
ACGATACGGGGTCTGACGGTGGGCACCGGGCAAGGCATCAACTTCCTTGACCGAGCGGCC  
GTGCGCGTCGATGATCTGCCGCGCGCGGGCGATCTGGGCGGCGGTGAGGGCAGGGCGGGA  
CCAAGCAAGACATAAGCACGGTCAAAGACGTGAAGCCCCCGGAACCCATCGATAGAGGGT  
CGGCAAGGAAACACCAAGATGCTCGGCCACTTCCCTGCGTGCGGTGCCGTTATCCAAAAG  
CTTCTGGCCGATGCTACCTTGCTCTCCGTCAACCCGCTTCTCCCCGGCATCCGCCC  
GAACTTTCGGGCGGCCTCCAATCCGGCGCGAGTGCGTTCAATGGTCAGATCCCGCTCCAT  
CTCGGCAAGACTGGCCATGACATGAAAGAAAAACCGTCCCGATGGCGTCCAGTATCGAT  
AGCGTCGGTCAGGCTTTTGAAGTGAACGTCCCGAGCTTGCGAGCTGCTGACCAGGTGCGAT  
CAAATTCGCGACGCTGCGTCCAGACGATCCAGCTTCCAGACCACCAGCGTATCCCTGC  
GCGGAGCTCTCCAGCGCCTGAGTGAGACCCGGTGCCTCTGCGCGGGCACCCTAATCTG  
GTCTCCATGATCTTCTCGCAACCGGCTTTGGTCAGTGCTCCCTTTGCGAGTCCAGATT  
TTGGTCTGGGTGGATACCCGGGCATAACCGATCAGCATATTTTTCTCCTGACTCTCTCG  
ATATTCATAATGACGGTAATGAATCAAGAAACCCGTTTCAAGACCTATTTTCGAGAACC  
TATCTGTTGATTGTTGGTCATGGCACCCGTGGCGGGTTTCGCTCTCAAAAACCCCTCGT  
TTGTGAGATGTTGTCACAGTGACAACCGCAGATTAGACCTTGCCGGTTGGTATGGCGTTG  
AAGCTGGCCCGGTCTGGATCTTCCAGAGGATCTGGATGCTTTTGGTGGCCGGGGATTTTC  
CCGATATTCTCCGCTGGGTTGCTGGTTCCATCCACAGGGTGGCGCACAGAATTTGTGGAC  
GGTTTCCTGCAAACCCAGAAACCGTCTAGTATATACTTTAAGGACCGCATGATTGGCCAA  
GTGGGGGCTTAAACCCGCACTAATGATCGGTAATCAGAGGAGCACCAGAAATGAATGCCG  
TTTTACCTTCTATCATCTCCGAGTTTGAGACCTCAGATCAGGAGGCTAGCTATACTGCGT  
GGCTGCGTACAAAGGTGCGCTCAAGCTTGGCTGATAAGCGACCCAGTATTCCGATGACG  
AGGTAATGGCCGAAATGGACGCGATCATAGCGGAAGCGGAAACCTCCGCTCAAAGGAAAT  
TCTGAGTTGTTACCCATTATCTGGCGGGCCTCGGCCCGCGATGACTTGGCGAATATCATT  
CGCTACATCGCCAACGAGAATCCGCCAGCGGCACGGCGTATGAAACGCCTGCTGGAAGAG  
TCTGTCTGCTACTGCCGAACATCCCTATCTGTATCGTCAGAGCGAGCGAGTTCCCGGC  
CTGCGCGAGATTGTTGCCCATCCGAACATATGTCGTTTTCTATCGTGTTGCAACCGCCAGC  
ATTGAGGTTGTGAACGTGGTGCATGCCCGCCGTGAGTTCCCGGTTTCAACCCAAAATGAG  
TAGCTCATCGTAATGTCGCAAAAAGGCCCTCACGGATAGATGAAGAACCAGCAAAAT  
CAGGCCATCCGCCAGCCGTGGGCAGTGCCACGAGACAGAATGATCCCTTCTGTCTCGT  
TTCCAATTTTCGGCTTCTGGCTAATTTCCAGCAATCGATCCCAGGCAATAATCAGGCGTC  
TGGATCTGGCCTGATGCTATTGCCCGCCGTGAAGCCATGGAAACGACTCGGCGCAAGGCT  
CCAACCTTGTGTCATAGCATAGGCTATGACACATTGCACAGACGAAGAATTACACAACA  
CGACAAATAAAGTTCCCGCAGCAAGCTGCAGGATGTTACATCAGACACAATTTTCTAGG  
TTTCGATGCAAGCAGTAAAGAATTTGACAACGACGGATAAATCACCAGAATTGTTCTGAC  
TCTGATTGATTAACAGCCCTTCTTGATTGTCTCCAAGTTCACCTGATATTGTTGTAAAT  
ATCCTATCCTTGATGAGTTGAACGAGTTTCCAACAAGTCTCTTTAGCACCAAGATGGCG  
ATTGGAGTAACTCTGTTTTTTTGGAGAAATTTTTATTTATCAACCCCTCATTATCAGTA

TACTTATCAAGTAACGTTCCGTATTTGTCGATTATTCCACCAGTGCTTTTACCTTTTTTTC  
CCGATAAGCGGGTCTGTAAATGGTGAGTCTTGAAAGAATATGTCCCTCTTGAGAATTACT  
CCACGCGGAAAAAAGTTCTCAGGAGAATGATTTACTCCGATCCCAAGCTTTCTTATTTCA  
TCGAGTATTGATAACGATAAACCTGCTGACTTCCTATATGTTGCGCCATCCCAAAAAAAT  
GTTTCCGGTTGCATTGGTTGTCCAATTATGCATGATGAACCAGGGTTTGTACGATGAAG  
TCCTCACCGTATGGAATTAAATTTGTAACAATATTATAGAGGTAAACATTATAAATAAGC  
CCAGTACAGCCTGGCTCATATGAGATCATCTTGTTATCATCTATTAAAGCTGAGAATGCT  
TCTCTCTCGAGTAGTTTCAAAAAATTTGTTGCTCCATCTATAGTTCTAAAGAAAAAAGAA  
AAAACCTCTCTTATGCTCATTTCTTTGTACGCTATTTTTTGTGAACACAGCACTTCTAAAC  
TCGTCCCAGTCAATTATCTTTGTTGGATTATCACTAAAAAACCATATTTTCAAGAGAGTTA  
TTGTACAGATCTCTCGCGGATAATGTTCTTAAGAAAACAGACTCGTCTTGAATTTGTATA  
CCCTTTTCCCGTGAGTACTCAACCAACTTCTTAGCAGACAGCAAATATCTTTCGCTACCA  
ATCGTTACCAATGCCTTATAGAGCTTATTTACTCTCTGTGATTTATCAAGAAATCTGTAT  
TCATTAGGGTAAGATGAAATTGTTTGTGGCGCTACCCCTAATAATGCTGCAACTTCTTGT  
AGCTTCAAGCCAAGGTATGAAACAACGCTTCCGTCTTTAATTATATCTTCCATTTTTACC  
TCTAGTATTAGCATGAAATGGTGGGCTATACATTAGCCCACCGATTTTTAGCGTCTCTTA  
TCAGGCTCTTTCGCTACACCCCTATATGGGACTTCGTTTTTTGCCGAGATGAATTTTCCA  
CTTTCGGAGTTGCGCTTTACCCATGTGTCAATTCGTGGATTGTATGTTTGTGAACGATTA  
CTTACAGAACCTTTTCGATATCCATTGCCCCGTGTTTGCAGCCATTATTAATCATCCTCTT  
CATCGCGGAAGGCGTAATCATAGATGTCACTTGCCGCCTTGCGCGCAACGGTGCCAATAG  
CAGCTTCCGCTGCGATGATAAGAACTGCTTCCAGCGTGAGTCCAGCCAAAAATTCAAACA  
TGGCGCCCTCCATGAGCTGCGACATTGCCAAAGCCGGATGAGGCCAAACGACGGGCAGCT  
GTCTTGAAATTACGAATCGCGCGAAAATCAGAAGGAGATGTTGGAATAGTAATGAAATCA  
AGAGTATCGGTATTTTTAGCACGGAGCTGATGCTTTCCACGCGACTGGTATACGACCAGT  
CCAACATTCACAGCGAAATCAACAAAGTCAGAATTTTTTCATAATAATATCCTTTAGTTAA  
CCAGTTATGCTGCCGACTTCTGCACTCGTAGAACAAACCGTGCGAGAAACCAACAACAGGT  
TTTATTATAGCCATAACGATAAGCATGTCAAGAGACGAACCTTTTATTCTGTAGTGTTAA  
CTTATTCTGCTACACCAACCAACAAAGGTTTTGTAACGATTGCGTTTTCTAGACGCTTTC  
AGCCCAGATTGCGCGGGGTGAAGTGTCCACAAACCCGTCTATCTTTCTGCGTCCGGTAAA  
CCCTGCCCGTTCAACTGGTCACTGTGACAGCCTCTCAAACCGACCGTTTCTGAGAGGCC  
CCGAGTTGTGAGAATCTCGCTCCCGATTTTACTGGCGTTATGGTTCTCGAAATTCAGTCT  
CGTTTTATGGCCGTGCGGTTGGATGTATTTGAGAGTGCACGGCAGCTGAGTACGGTTCC  
CTGAACGCTTGTTTAATGGACACTTCCTAGCCCGACTCAGCCCTGAGAGTGGCCATCAAC  
CTGAGCGCACTTCGTTCAACAAATCAGGATGCTTATCCAATATCTTGAGCAACTTCACCA  
GTGACAACGGCGGCTTGGTCTTGCCCGTCTCATACCGCGAGAACGCATTGACACCGCCCC  
CGAATATTTCTGCCGCTTCCCGCTGATCCAGTGCCAACTCTTTACGTACCCGTACAATAA  
AAGCGGGATCCACTATGGATGCATTGACCTGCCGGGAGAAAGAACGCATCTCGTGATCA  
CCCGATCCGTTTTGCTCGCATCCAGAAGAGATTCCGCACAGGCCGGACAATAGTCTCCCG  
TGACCCCTGGGATGATGGTGGTCTCCCCCTTGTAGGTGTAGGGCATATCGCGCGTATCGT  
AAATAAGCTCCGCCGCACCGCATACCGGACATTTATCGTCATAACTCCTTAAAGACAC  
AATTGGCACATCGTCCACCACCGTCAATTCCAGGTAAACCTCTCCTGCCGGGGTACTCGG  
TCGATACACATCCTGCCAGACCATATGATCGGCATGTGTGGTCATGCTCTTGTGAAAATC  
GGCTGGCGTGAGTGCTAATACTGTGGCCAGCATTCAGCATAGTCGAGACCCATGGCGTT  
GGCGCCGACACGCGCCGAGCGTAGTGCGCGGTGCGCTTTTCATAGGGCCATATTAAC  
CTAAGTGGTTTTTTTAAACAACCCGTACACCACTCCCGTCATCCCGGCCCCCAATCATCC  
CCCGGGGTACTACGCCCACTTTTGGGCCGACTGGGAACCTCTTGCGCATTGCGCAGGCTT  
TGCACCTTCTCCCCGTTGTGGGTCTCTCGGGCAGTGGGTGCTGTATCGCGGCACGCTTT  
CTCTCTTCCGCCAGGCGCTGGCGTGCGACGAGGATCTGCGGCTGTAGCTCCGAGTTTCGA  
ATGGCAATGCCATGCCCCACGGCGAGCCGGATAGCCTGTTTCTGAAATCGGGTATCCCCA  
TGGAGCGTCAGTTGCTTTCCATAGCGCTGTTGGGCCAACTGGAGCGCCGCCAGGACGCTG  
GCATCCCCGCGATCGAGGAGGACGATCTTGGGCCCGGTATCCATGAAGGCGGTATGGCCG  
TACTGGTCTTGATAGAGTACTTCACGGCCCCGTGGTACCGCGTGATAGTCCCGGATATCC  
CGAGGCTCCGGGAGGGATGTCCGATCGAGTGCTTCCGGACGAATTTTCGGGAATGTCTTGC  
AGACGGTAACGCGTCGCCGCTTCCGGGCCATGGATCTGCCGGACCCAGTCCTCAAACGAC  
GGGAACAGCGCCGGTTCTGTTCCCGGAAAGTCTTGCGTAAGTCCTTGTGCTGCTCCAGA  
AGAGCGGCTTTTTTCTGAGCCTGTCCGGCGCGATGACGGAGCGCAGGACATTCAAATCC

GTCCCCGGCCTTTCCAGTTGCCGTTGAGCGCTTTGCGACGTTTCATCCGCCTGTTTTTGA  
TACAACGCCTCACGTTTCGGCGGCGATGCGGCGATCCATTTCCGCCTTGGCCTTTTTTGCGC  
TGAGCGGCGTGATCGCGCCGGGCGGGGCGTAATCCGAAAAACCCAGTACTCGGGCAGTC  
TCATGCAAGGGTTTCGGGCGTCGGCGGCACCTGTTTTTCGATGCCGGGTTGGGGGGCTTCA  
AAAGGCCCCAACGCTTTTCCAGGGATTTGAGCCCCAGGCTCCGATGGACATCAGAGGCT  
TTCGCTGGCACCTCTCCGATCAGCAGGATGGCGCCGGCACCACGCAATCGGTACGCCATA  
CCCTGATCTGCCAGGGACTGGTGAAAATCCTGCCAGGTGGTGGTCGCCTTGGCTAACTCG  
GGGACGCGCTCCTGAGCCAGGGTCAATGCGGACTTTTCGCCGGTACGAATCTCCTGATCA  
CGGATGCGGCCCCGGCTTGCGCACCGGGTTCGCACTGCGGATCAGCAGTGCGCACAACCGTA  
TCCTCCTGGACCTGGTATCGAGCATGGCGCTCTGGCTGCCAACCCTGCGCTGCTTCCATC  
CGTGCTACGGCTTTGAGGATTTCTTCGTGGGCGAAGGCAATGTGCCGGGCTTTACCGGTC  
AGGGGATCCACCCGGTTCAGTTCTACATGCACATGAAAATTATCCGTGTCTTCGTGTAAT  
CCGTAAAAACATTGGTGCTGCGCCATAACCCAGTTGCTGCATCAGGATGTCCACGGCCTGA  
TCGACTTGTACGGGTGAAGGCCGTTCTCCCTGCGGCCAGGACAGCACGATGTGCTCAATG  
GGATCCTTGGAGCGTATGGCTTCCATCGCCAGAGCGATCATTTACGCTTGCTGCGAGGGG  
AAGTCTTTCGCAGACAAATCCCCGGCTGGCGAAGTACAGGCATTTCTCGGCGCCATGGGTG  
TTTTCAGGGGCGGCGATGTATTCGGCCAGACCGGAGACTCTCTGGGCTTTGGAGGATTGC  
GGCTTGGGATTCTGAATCTGGTTAGCGATCATGGGCGATTCTCCGGATAGCCTCTTGAAT  
CTCGGCAAGCGTCTGAGCGGCTTCCCGGCGCAAAGCATGCTGATGGTCATCGGCCAGAAT  
GTAATGCTTGAGCAGGCCGCCCTGGCGGCGCAGTTTCGTTGAGGAGGGTGAGATCCGATCG  
AGAGACGACGGTCAGGCCCAAAGCGCGGCGGCGGATATACTCGGAAACGGAGAGCCCCGGC  
AGCCTGCGCCTGATCGGAGAGCTGTTGCCGCTCTGTGGGCGACACGCGAAACGTCACCGG  
GATCAGCGGCTGACCTATCGCTTTCTTTGCGAACTTCCCATTTTCATGATGCAGTTTCATT  
CATGGTGACCTCCCAATGCAGGGGTCAAGGGGATACCCCTTGATGAGAAAAGATGCGAA  
TAAGGCGAAGCCGTTGAGCCTTCTGTCCATCACGGCTGAAGATGGCGCAGCCATCGTAAG  
CGTGGTGGCATCCTGTATACCTAAAATTAGAGGCTAACAGAAAGTATAATAAAGTAGTAT  
AGCGTATTTTGTACAGTTTATCGTCGATCTCTGTATCTTCAGAATCACACTATTGATAAT  
ACAAATAAAAAGCATATATTAGAGGCCGTGATTCAGCCACTCCGGAAGGTAAACCATGGA  
CCAGAAGCGTATTGTATCATATTGATGAACAGCTCATCGCCGCTATCCAGCAGGAAGTGGC  
AGAAATGCCTAGGGCAGAAGGGCCCCGGCAAACGACGAAAACAGAAGCCGTGCGCATGCT  
CAAACCGGCCATTCTGGAAATGCTCAAGAAGGGGTACAGCTATAAGCAAATAGCCGACTA  
TCTGAAGGATAAGGGACTACCGATCAGCAGCGTGACCATAGCCAAGGAAGTGCCAAGCAA  
GAAAACCATGGCCAAAACAAAAATAGGCGTGAAGAAGCTCGTGGAGGGAAACAAGTCCGG  
GTCTGAGACTTTGGCAGAAGATGCCTCCGCAGCGCACGCCATTCCACTGGAAGATGAAGA  
GGTTTAACCATGAAGCCGGTCCTCTATTACATCGGTGGTGAAAAGGGCGGGGTGCGGAAG  
TCTTTGCTGTCTGCGGCCATCGTCGATTATTACCGCTGCCTGAATACCCCCGTGGCACTG  
GTGGAACCGATGAGAGCAATGCGGACATCGGCAAGACGCTCAAAGATGAGGTGCCAGTG  
CTGGCTGTGGACACACGAACGGAGCAGGCCTGGGAGAAGCTGTTACCATTTGTGAGCAG  
AACCTGGTGTGGTGATCATCAACAGTGGGGCCAGGGATCTGACCGCCATCGGAAAGTAT  
GGCGTAGATTTTCTGCCC GCCATCGCGCAAGCGGCAATGATGCGGTTAGTCTGCCTCTGG  
CCATTAAATGCCAAAAATGAGCAGGATGGGCTTCAGGGTGTGACCCGGTTCCACCGCCTC  
CTGCCCGAGACACCCGTCATCATCATGCAGGGTGAGTGGGAAGGTCCTCTGGGCGATGAT  
TGGCAGGGTAGCAAAGCCAAGGGATGGGTAACGGGCGTTGTTACAGGTGCCGATCGCCAAC  
GATATGCTCATCAAGGCGATAAAAAACGGCCGTCGACTCTCCATGCAGTCGGTGATCGAC  
AAGGGCAACGTTCTGGAAAAAGCCAGTGCGAGTGGCTGGCGGACACGCGTGGCCACCATG  
ATGGAACAGGTGGAGGCGTTGATCCCATGATTATCGAAAACATCTGGAAGCAATTGTGCG  
GTACAGCCCCGGATGACGATCGGGTGAAGCGTATCAACGCCACGGCAAAAGCCATTGGTA  
TGGACGATGATATCGGTCTGCGCCTGCTGACGGTGATGGAATACTATCGGGCGATCTATG  
CCGGCGCGCCGGCCAGGATCACCAAAGCGGTCACGGACTCGGTAACAGAAGCCAAGGGAT  
TGGCCAAAGCTGGCATTGAACAAGAGATCGCAGGGATGTTGCCATCCATAACGGAAGGCC  
TCAGTAAAGCCGTTGGTCAGGCGGTTCTGCTGCGCCGCGTATCCATTAATGGCACGGTAG  
CCCTTCTGGCGGTTTTAGCCGTCATCGGCGGCGGCTTCCTTGCCCTGGAAAACTGCCTATC  
AAGCGGGGGCACAAATGGCAACATGGGTGGGATATGGGAAAAGTGGGCGTGCTTGCCCCGT  
ACGAAGAAAAAGCCAATTTCGACGGAACGATATGCGGCAGCACTGGTGGCGGCGAATCAAG  
ATAACAATGTCATCCAGCAGATGGCAGAGTGTTCCGGGTAAGGATATGGAGAAAATAAACT  
TCAAAGGAAAGTCCGCCTGTGTGCCTCAAGCGGGTGCTGACGGTTGGTACCTCCCGGAAA

TCCGCGGTGTGCCAACCCATAAATAAGGGGGGGCCGACCTGCTGTGGCGCGTGGCCCATG  
 GAACTAGCCGTCCCACAAGAGGGCTGACGGAACCGTCACTGTGACGATCGGTGCGCTGTG  
 TGAGAGCCCCACCAAGAACCCTTACACATTAAAGAATCCGTATCCGATCCTCGTTTGCCC  
 GATAAATAGGGTTATTGTACGGGCTGGCCTGAAAGTAAAAACGCCCGCAGCGTCATGATC  
 CGCAACGGCAGACCAGGAAGATCCATGAGCGGCCCAAAGTGTCGCACATCTCCCGTCAGC  
 AGGGCGTCCACACCAGCCGCCACTGCTACGGCTAATACCGGCAAGTCCTTGGCATTCAAA  
 TCCACGGGGAAATCTACCTTCTTAGCGTGGGGCACGACTTTAACGTCTGCCAGTCTCGCT  
 TCCAGGTTGGTCTGTGCCGAGGGGCGTTTGTCTCGATATTGCGTCGCGCCTCCGCGAGG  
 CAATAGGCGCTACTGCATAAGGCGACTTTACGCTGTTGTGCCAATTCCCAAAGCAGAGCA  
 AACGCCTCCCCGCCGAGGGCGGCAGAAAAGAGAATATTGGCATCCAGGAAAACGGTAACC  
 GCTTTCCTCATGCTTCCCAAAGCGTCGTGCTGCGCCAATTCGGCAGAGCTCATCACGG  
 ATTCTTCCGCAAACCTCCGCCATGCGTTCTTCGGTATAGGACTCTACTGGCAGAACCACCG  
 CCGGAACCAAAATGATCCGCCCCCCTCCAGGTGCATCAGAAGGGTGTCTCCAGGCTTCA  
 GCCCTAACTGCTTGCGGGCTTCTGCCGGCAAGGTAATCTGGCCGCGTGTACTAATTTGTG  
 TCGTGATTTCCATAACCGAAAGCATGGCTGAAAATCGGAAATTCGCAATGATCACAAGC  
 AGGGTGCCGGATGACATTGCCAGCCATAACACAGCCCCCTCCGTGTGCGTTTATGTTTCA  
 TCCGTCCCGGCTAGATCTTGGCTGCGCTTAAACATAAAGACTCACCGCCCAACATCCTTC  
 TCCAGCAATCGCCGCACATAACCGTGTGTAGGGAATACCTTGGGCCTGTGCCTTGCCTTC  
 AGGGCTTCTAGCAGCGGAGCGGGCAGGCGCATGGTCAGCGCCGCTGATTTGGGCTCGAAC  
 TCAAAAGACGCTGGTTGGAAACCAGACAAGTCATATTGAGACAGGTCTGCCGAATCGACA  
 AAATGCTCTGCGTCTGTATCACTCCTGAGTGAGGGCATGGCTTTGAGCTTGGTTTTTATA  
 GTGAGCAACCTCCTTTGGGTGCATGTAACGGGCACTGATCGGCCGTAGCCAAGTCTTTCC  
 ACGGATTTACGCTTCATGAAAAACAAGAAAGACATAGCGCCCGGCTTTTCGTTTTTCCAAT  
 GGCTCTCATGCGGGGTTTATCTGGATGCGGGTTCGGCCATCACCGCAGGCGTACCCCTCAA  
 TACTTGCTCAATTTCTGAACGGGATACTCCGTGCTTACCGCATTTTCGGCCAGTTCCCATC  
 GTCCCAGTCGAATCCTGATATGGTCATCGTTGAATTATGTACTTTTGTACAAACAAACGC  
 CATGCATTTAGAATCCCATGATCCAGAGGACTTCATACTCCATCGGGAAGATAACCGTGT  
 AGTTTCCGGGCCCTTGGCCACGGCTGCTGCGAGGATTTTCGGCGTGTCTGTTTGGTAACG  
 CTTAGGGCGACTACTCGGGTAGGCCGTTGGCCGATGCGTCCCAGCTTTTGATGAGTTCC  
 CACTCACCCAGAGATTCTGCTGCAGGGTAAGACGGTAATAGCGATAGAGATCTTTCTCC  
 GGCTGGATTTTCTGCCACTCCCGTACCCACCAGCGATCCATGTCATAGACCAGATCGGCG  
 GAGGATGATGATGTCATAGGCATGGCGCTACGCGATAACGTCCCGCTCGGGTACCACCGT  
 CCCGGCGTGCTTGTAGATGGTGAACGGGATACGCCATAACGTTTGGCCACATCCGTCAC  
 CCGCACCCGGGGGTTTTTGGAGGAGCTGACGGATTTCCCGGATTTCCCGGACTTCCAATTT  
 TGGCGGTGCTCCACCCTGGCGTCCCCGGGCACGGGCGGCATCGAGGCCT

## 10.2 Anexo 2

### Secuencia del plásmido pAfPQ510-2

>pAfPQ510-2

CGGCAGCCTCTATGGCTATACGTTGCCGTTTCGCTGGGTGTCTCAGGCCATGGGAAGTTGT  
 TGTAGACAATGCCGGCAGAATATTGATAGCGGCTTTCCAATCGCCCAGCAACAGCGCGCA  
 TCCAGGCCATGTGCATCGTTCGATTGCAAGACACCAAAATGAAAAATTTTCGCTCCGGGCA  
 CGATGAGGCAGCTTCCGCTGGCAATCACCATAGCTGCCATGAACCCGATGGGCATGATAG  
 GGCGATTCTCCGATGACACCTTGGCAATCAGCAAATAGCTGTTGTGAGGCTGGCGAATTT  
 CGCCAAACAAGGCCGGGGTTGCCGCTAGCGCGACCGTCTCCTTGC GGCTACTGGCTTTCC  
 TAAATGCCCCGCACACGGCCAATGCGTTCCCGCAAAAACGGTGAATGGCGCAGGAGCGGCA  
 GTGGCGCATCTGATAACCAAGGCACCATCGCTGCGTGTTATTGAGAAATTCCTCCCCGC  
 CGACGTATGGCCTGATGAAGGGGGCCGATTTGCGGTTCCCGCAGCTATGGCCGCATTTTCGCT  
 CTTCCGTACTCAAAATAAGATGGCCATCATCAATTGGCATACTGCCGTAGTTGATGTTTCG  
 GGGTGAAGGAGCTAAGGGGCGGCCACGTTTGGACAGGACCACATCTACCGCATCCACTA

GGTAGGGATTGATGTTCCGCGCCTCCACTGGATGAGGTTGCCATCGATCTTCTCATAGT  
CGTAGATCATCCGCCGCTCGGTTCGCTAGGGCCAAAACCGATGATGACGCAATGCACAG  
CCGCCCTTGCCGCGCCCTTCGTTGCTCCATTTGAAGGTGCGATGGGCAAAGTGGATCTTCA  
TGCCTCTAACCCACAGGTGCGGCCAGAGAACGCCAGGCTGTTCTCCCTGGGTGATGGAGT  
TTGTGGAGACGAAGGCGGCGCTCATGGATGTGCCCTGCATGAACTCCGCCGCTTGCGGT  
ACCACGCAGTCACATAGTCGAGGACACCAGCTCCCTTGACACCGTGCATGATCGCCAAAA  
ACTCTGCCTTCTGGGCTTTGCTTTGCTCTTTTTTACCCACAAAAGGTGGGTGCGGAGGA  
TGTAACCTACCTGCTCGCGGGGAACCACTGTGCCCCACTCCAGCGTGAGGGCGTTGTCTAT  
TGACGATGTGCGCGCTGGTGGTCAGGGGCAGGCGGGCGTAATACTGCCCCAACTCCTCGC  
TGACACGTTGATTTCATCTGGTGATCGGTGAGCCAGAGAGCCACCTGTGCGATCTGGGCGG  
GAAACTCTTCGATCTCTATACCGAAGCACTGGTCCACGTTGACCTGGATGAGATGAAAAA  
TATCCAGAGCGAGTTGTCCGCTATCGCGGAGCAGGCGCAGGATCTCCAGCTCCAACAGGC  
GCAACTCCCGATAGGCCACCACTAAGAAGTTTCCGCAGCCGCGAGGCCGGGTGCAAGAGTG  
TCAGCTCACGCAGTTTGTGTTGCAGATCTGTGAGTTTGTGGGCGTTACCTTTGGCAGCGG  
CGAACTCTCTATGCAGGTCATCCAGAAACAATGGCTTGATGAGTTTGAGAATGTTAGTTT  
CTGATGTGTAGTGAGCGCCAGATTGCGGCGGGCGGCGGGGTCCATGATGCTCTGAAATA  
AACCACCGAAGATGGCGGGGCTGATCCGGCCCCAGTCTAAGGCACAGGCATCCAGCAGCT  
CGATACGCATGGCAGCATTAAAGGCTGGGATGGGAAGAATTTCCGGCAAAAAGTCTGCCGT  
TCACATAGGGGAAGGCAGACAAGCGTTTCGTGAGGCTCTTTTGGCGAGCTTCTGGCTGTG  
TGTTGAGGATCTGGAAAAGTTCGGTGAGCTTCGGGCCAAGGTCGCGGCCATCTTCCTGGG  
TTTCTTGTTCCACCCATTCCCCGAAATGCCTGGGCGGGCTGAAAAAGCCCGGTATCATCGG  
CAAAGAGGCAGAACAGGAGGCGAACCAGCAAAACTTCCAGGGGATGATCTGTGTAGCCAG  
AACCCTTGAGTCGATCATGGAGGCGGCCCATGCGCTCGGCAGCATGGATGTTGACCGGAT  
CCTGTGGCCGAATGGCCTGACTGTGATAACCAGCGATGAAACCGAATAACCGAATATGCT  
TGTGCAGGTCGGAGAGGGGAAATTTCCATTGCTGGTCCGTCTCCAGGTCAAAGAGACGCA  
TCCTGGCGAAGTCGCTTACCAGGACGTAGTGCGGGAGGTCACGCTCTGGAATACCTGGGA  
AATAATCGATAGCTTGGGCGTATGCCCCGTTTCAGATCCTTACCCCTGGATTTGTGCTCTA  
CCAGTAGCACGCCTTTCCAGAATAGATCGATGAATCCTGTGAGATGCGCCCGCCGTCGC  
TGCGTTGTTTTGACTGGGGCCTCGAACTCGCCAAGCGCCGACGCGTGACGCCAAAGACAT  
TGAAAAAGGCATCCCAGAAGGTCTTGGCCTCGGCGTCCTCGCTACGTTCTGTTGCCCAAT  
CGCGGGGAGAATGCCGTGGCGCGGTGCGGATTTTCGTTCCAGGAGATGGGTGGCATTATAA  
TGAGAGCCCCGTATTTTCATGGCGGGAATGGAGGTTATTTTGACCAACATTTTGTGTTGACCC  
GGAAAATATCCTGTAGAAGCGAGGATATCACGAACCTCTGGGGTTATGAGTGAGATAGGC  
GCTCGAAGGTTGATCGATCCATTTTCTGGGTGAGTGTTCGCGGCACGGCAAGGTAAAA  
CGCTTTGGTTTCGCAGCCATGCGTTGAAAGTAACCCATTCTTTGAGGCTTCCTATCCGGC  
CTACCAAAGCATAACGCCTCATGAGAGCACCCATGCGGCGTTGATCACTTAAAGAAATGA  
GACCTTTTGCACCATTTCTGTCTCGTGGCCTTCTCCACGCCTATCGCTAATGTACTGATTC  
TTCTGCTACCGGGCAAGGGCCGGAAGGGGCTATGATGAGACATTACGATCACGGTGGAGA  
TTTTTGGGCGATGGCGGACGGGAAAACAGGGCGGAAACGGCGGGGGGCGATCGATGCGGAG  
GCACCGATTCCGGTCGTGCCCCGGCAGGGGGAGTTGTTTCGTGGAGATGCCAGCGGAAACG  
GTCACAGCGACGGCTGCGGCACCCGCTCCGGTCGAGCCGGAAGCCGCGGGCTCGCCCCCT  
GATGTGCCGTCCGCAGGACAAGGGCTGTTATCCGCAGCAGAAGCCACTCCCAAAAAGCGC  
CGGACGGCCTCGGAGGGCGAAAGAAAGCATCTCACCTCCTGGAGGTGGATCGCCTGCTG  
GCGGCCACGAAAGACAACCCCCGGACCGCCTGCGCGACCGCTGCCTGATCCTCCTGATG  
TTCCGTCACGGATTGCGGGTGACGGAGGCCTGTGACATGCGTCTGGATCAGGTCGATCTG  
GAGAGCAAGATTCTCCAGGTGCAGCGCTCAAGGGCGGGCTGTCCACCACCCAGCCACTG  
CGGACGGAGGAGATCCGCCTGCTGAAAGGCTGGATGGCCGAGCGGGAGCGCTGGCTGCGG  
CAGTGGCGCAAGAAAGAAGGCGGCACTGGGGCCGCCCTGGATCGTCATGCGCTGTTTCTG

AGTACCCGGGGGACGGTGCTGTCGCGCAAGACCTTCTGGGCGCTGCTGCGCCGCTATGGG  
GAGCTGGCGGGGCTGACCCTGCCACCCCATCCCCACATGCTCCGGCACGCCTGCGGCTTT  
GCCCTGGCCGACCAGGGCGCCGATACCCGGCTCATTGAGGACTACCTGGGGCACCGCAAC  
ATCCAGCATAACGGTGCGCTACACGGCCACTAACCCGGTGCGCTTCGAGAACTGTGGCGG  
TGATCGCTGTTGATTTGTTGAATGGTTTCGTACTACAAGAAAAGACAACACATCATAACCG  
TAATAATATGGCAAAAAGTTAACCTGTCAGAGGCTGCTGGCTTGGTCAATGTGGCCAGATC  
AACACTCTACTCTTATATAAGATCAGGAAAGTTAAGCGTTGATAAAGATCACCTTGAAAA  
GCCACAGATAGACACATCTGAACTGATCAGGGTCTTCGGCGTCTTGCAAGACAACGATAA  
AGACAACAAAAAAGACACAGAAATAACACCGGATACGGTGACAATACAGAGTGAAAACGC  
GGCGTTGCGCGCAGAAAATGAAGTGCTTCGTGAAATGCTGAGGATTCGCGAAGAGCAACT  
TCGTGAACATCAAGAGCAAGAGTCATGGCTCAGGCAACGCCTGGACTCATTGGAGGCTAG  
GTTGTTACCTGGCTCAAGCGCCAAGTCATGGTGGTCAAGAAATTTTTGGTTCTAAGGGGTA  
GGCTGAATGGTGGTGGCGCTTCCCTTTGCTCTGGATCAGGCGCAAAATGATAAACCGTT  
TAACATGTTTATCGCGAGGTTATTATGATTGGGGTTTCGTCTGTCCAGCGACATCGAGAAG  
CGTCTAGATGCGTTGGCAAAAGCGACAGGACGCACGAAGACCTATTACGTCCGCGAGGCT  
ATTTTGGAGCATCTGGATGATATGGAGGACGCTTATTTGGCCGAAGCAACCCTGGAGCGT  
GTCCGGCGCGGGGATGAGCGCGTATTAAGCAGCGAGGAATTCTGGCGTGGTCTGGAGGAT  
TGAGTACGCGGAGTCTGTTTCAAGAACGTCGCAAGGCTTGATGCACAAGAGCGTAAACG  
CATCCGAGACTTTATCGAGGTTAAAGTGGCCCTCCTGGATGATCCCCGCAGTTTGGGTAA  
ACCGCTTTCTGGAGGTCTCAGCGGTCTCTGGCGTTACCGAGTAGGAAGCTACCGTGTTAT  
TGCGAATATTGAGGATCGTGATGTGCGCATTCTCGTCGTGAAAATCGCCCCACCGGAAAGA  
GGTTTATCGTCAGTGAGTGGTCACCTGCGTCCAGATCGCCATTTTGGTACTGATCTTGCT  
GAATAGTGGCTTTCTGGCGTAGTCTCAGAGGATCAACAACAGCCCAAAGGCATTACCCAT  
GATAGAAATGGTAATGCCCCGTAACCTGGACGTCTGGGGAGACAAAGGTATACGGGGCAT  
CGAATCCGAGGGACCGGACAGGTCCAGTATAGCCCCCTTGCTATGCAATCAAAGCCTG  
TCCGGTCCCCATGCAGAGCATGAGCGCGATCGGAGGCTTTGATGGCCGCGATTGATGCCC  
TTTCCCTCTTTGCCGAACACCTGCCCCGCAAGCCGTATTGCACGGATGATCTGACCGCAG  
GGCTGCAAATCCGCCCCCTGAAAACCGCCCTGCAACGCGCTTATATCCAGCCCAATGGTC  
CGGGGATGGTGTGGGTAATGGTCTATGACGTGGACCGCGCCTGCATTGACCCGCAAGACT  
GGTGGCCGGTCTGGGAAACCGCTGGGCTGCCTCTCCCCAACATGGCGGTATGAACCGTC  
GGACGAAACGTGGCCACCTGATCTATCTGCTGGAGGCAGGGGTCTGCCGGACCGAACTCG  
CACACCTCAAGCCCCTGCGGTATATCGCCAGTATTGAGCGGGCCTATACCGCCGCCCTTG  
ACGCTGACCCCGGCTATGCAGGCCTCATCTGCAAAAACCCCTTTCAACGACCGCTGGCTGG  
TTTGGGAGATACACGGCAACCCATACACGCTGGGCGAGCTGGGCGACTATGTGGATTTGA  
CCGCTAAGGCGGTTTCCTTGCCCTCTGACGCATCCGAGAGCTTCGGGCTGGGCCGTAACG  
TCACCATGTTCCATACTGGCCGTAAATGGGCTTACAGGGCCGTTAGAGAGCATTGGGCAC  
CCAATGGGCTTGGTAGATGGTCAGAAGCCGTCCTGGAGCGATTACAGGCCATCAATGGCG  
AGTTCGCGCAGCCCTTGCCCTTTGCCGAAGTGAAAGCCACAGCCAAGAGCATCAGCGGGT  
GGACCTGGCGGCGGATGACACCCGAGGCTGCAAGACCTCATCGAGCGGACCCATACGC  
CGGAGCAGCAGGCGGAAAGGGGCCGAGGGCCACCAATCAGGCTGAGGCTGGCGTAGCCA  
GTGGGCAGGCCCCGAGGCAGTCCAGCGAGCAGGACAGGGCCACGGCAAGGCTTATGCGGG  
CGCAAGGCTATACGCAGCAGGCAATAGCCGTGGTTCTGGGCGTGATCGGAATACCGTCT  
CCTCATGGTTAAGCGATGCACAGTGAACGGCCTATATCAGATAATAGCCCTGTGGCTGGC  
TGCAGGGCTGGGGGCCTAGCACGGCTTGTCTTAGTAGGTGGAAAGAAATAAGCGCTTTAG  
CGGAAGGAAGTGTGGGAGAACAGCGAGGAGTGGCGGGTGATTGCTTGCGGATCGCCCGA  
CGCTACCGCAACCAACGGAGCATGGCGACGCGGAGTGCCTGCTACGGAGTGGCGCGGGTG  
TGGCCTGCACGGGCTGGGTGAGGGGTCTGGGGAGAGGGTGCCGCTTTTTTCGCCCTGGCG  
CTTTCCATATCCCGGTCATGGCCTTGTCCACATTGCCCACAGGGTGCCCCACAGATTTTG

GGGATAACCTGTTTTTCAGTCTTTGGGCTGGGCGTACATGGTGTCCAGCGCGCTTTTACCG  
GGGTTCCTTCGGCATCGGTCCAGACGACCTTGTGACCTTTGCCACCTTTGCGGGTATCG  
ACCACTGTGACCGATTTCCATTCCCCGTGATCCTTGATCCAGAGGGTGGCGCCGGGTGTG  
GCGTCTTTGAATTTGGCTTTTCATGGGCCCACCTCCTTCCTTGTTTTGAGTCCCAGAGAT  
TGACGTTGCCGCCTTTGGCGTTGATCGCGCAGCGCGGCGAGTGAAGTGCCTGCTTCCTTG  
CCAGTTCACGAGCAACGCATTGGTGTGGGTGCGCGTCAGGCGAAGGGCTCCCGCGATTT  
CCCTGCAGGTGCTAGGGCCGTGCGCAGGCAATCAAGGACGCGGGCCATGTCCCGGGTGA  
CGATGCGGTGAGTCATCGAGTGGCGGCCGCGTGCTGGGGAGGTTGCGTAGCCCGCGGCTC  
CAGAAATCAGCGTTGCGGCTACTGCGGGAGGAAGGCGCCGACCGTGACCGCGCATGGCTG  
ATGGTTCGCGGAGGGAATATCCAGGGCGGCAACCCCGTCCGGGACGAGTGATTCAATGGTT  
TTCTGCGAGTCTGTGGATTCTTCGTGCATGGCCTTTTTTCAAGGAAAACGAATCGATACGT  
CCCTCTGGCGTGGACCGAACGTATGGAATTCTGGTTTTACGAAAAAAGCCCCTGCGGAC  
AGGAGCATAAACGATACGTAGGAGGTATACCGGAAAAGTGGTGCCGTCAGGACCTCGTCG  
CGGGCGCATCAAAGGACCAGGGAAGCACCTCTTCCAGTATAATCATATCACGGCATATTT  
TTATATCAATACGTATGCGGGCTTTTGTGCGGTGTTCCGTGTTGGGGCGGGATGTGCAGT  
GTTGCGGGGGCGTTTCTGGCGAATGTGGGTGCTGGATCGTGTGTTTTTGCGGCACCCTTTT  
TTTATTTTGGGGCAGCAGGAATCCCGACCACTTGAGGAGAGGATACAACCGGATTCAATT  
GCGCTCGATATCCAGAAGGATTCTGTCTGCCCCTGCAAGTTACCAGAAAAATGCTGATGGA  
TTCACCTCTCCGGGTACGGGGGGGGCGGGTAACGAAATTTGCGTCGATCCTGGGGCAAAT  
ATGGGGCGTTTACAGTAATACTTTGCGACCCCTTTCAGGCCATGGAAAACCTGACGGGT  
GCGTGGCGGGATTTCGACCGGGTGACGAACCCCTATCCCCGGTGTCTCGCAAACGGGCGTAT  
CACTAACCGACATGGTTACGGTAACAACCGTTACCCGGTAACCGCTTCGTTTGTGTGCC  
AAGGCGCAGCCATTCTGATATTGCGGTTCCGTGATCGTCCGCAGGCGGTGCTGCCGTAA  
CCAGGCATTAATGGCCTCCCATTTGGGGTTCTGTTCCTCGTCCAGCAAGTACAGCGCCGC  
CAGGCTGATCCGATCCAGGACCCCTTGGGTATCGAACCCGGGAAACGTGCCGTGCGGGT  
CATCTGGCGGAGCGGTGTGCTGTTGGTAACGGGTGCTGCCTCGGCAAGCGGAGGCATGG  
ATATTTTCCGCACACTCCGTAGAGGGACGATGATAACGGGGCCGCTCAACCATGTTGCAC  
CGACGCAGTTACCTGGGTGCGCATCTGGTAACCCGGTTTTGAAATGGACCGTTTTTTTTGGC  
AGGCACCCAGACCGGCTCACCGGTCTTCGGGTGCGACTTTGCTTGGCAGGCATCACTCG  
GATATCGAAAGATCCGAAGTCCCGGATTTGATATGTTGGTCTTCGGCGAGTGCTTCTGT  
CAGCATATCCAGAAATGCGGTCTATGGCCTCTTTCACGTCCGTGGGCGGAGCCTATATGT  
GCCGTTTTTCCCGGAGGGATTGGGTGACGTGCTGAGCAAGATCGGGTTTTGTTTCATGGTTAT  
CCTCAGGCAGAAGGATTTGTAGCATAACCCAGAGGAAGACTTCTTGCGCAAAAGGCTTTT  
CAAACAGCGGCGACTATCAGTTACAGCGTAACGATTTGTCCCCCTGAAGGGCCTTATATC  
TGACGTTTATGCGCTTGGGTTTGTGCGCTGCTAATCCGGTTGGCATCACCCCTCGATA  
CCTTTCGTTATCCAGTAACAATCTGTCCCATGTTCAATGGTGCCTCCGGGGAGGCAGAA  
AAAAACCGGATGGCGTCTTGACAAATCTCCCGCTTCGTCTTTCAGACGCTTTCACCATC  
TCGTGAGGCGGTGCGGTATTCCGCTTCCAGCATCACTTCGAGGCGGATGTACATCAGT  
CCGTTTGGGTCTTTCAGTGCCCGTTTCCGATACTTCGCTTGTCTCTCTGCATTGCTGAGT  
GCCATATCGTCGATCCTCAATCTGTTATCCGGTAACTATATATTGCCAGTTACCGGGTAA  
CGTATCAACCCTGTGCGTTACCGTATAACGCTGCACAAGCGAATTGCAGAATTCTGAGGA  
GACCCCGATCAGCCTTAGCCTTTGGGTGACGGTACAGGGCCGTCAGCAGGTCCTTGCCC  
GTGTTTTCTTGGCGTCGGTCCAGGTCACTTGTGGCCCTGTGGCCATTTCCCCGCGAGC  
AACGTCTATGACAGCGACGGCTTGCCGTTGCGCGTGATCTTCCCGGTAGCGGTGGGCACC  
AGGAGTAGCCCCCTTGGAGGAGGCTTTCATTTCGGGGGATTTACGCGACGGGTGGATTTCC  
CAGAGGTTACGGGTTTCCCCCTGGGGCCTGTGGTACAGCGTGGCGCATGTATCAGGCC  
TCGCTCTTCAGGATTTGGACGATCCCGCTGACACGGGCGGTGCTGAGATGCAGTTGCTGG  
CTGATTTGCGCTACGGTCATAGGCATGGTGTGGAGGCACTGGAGAATGCGGTCACGGTCT



TGGGCAGCGAGTTTATTTCATTCTCGAAATAGTATGGACGCTGCGCGGTGCTGGCAAATGG  
GCATCCTGACCGCAGCCAAAGAGCACGGGCATCGGTATGGATGTTGTCCCTCTTTACCC  
TAATCGCGCATGGCATTGTCTGCTCAAGATGTTGGTCATGGCCTCGGAGATGGTTTTCTCT  
GCGCCCTCCCGTTTGGGTTCTGGGGTCTCGCGCAGGGTATCGAGCAGCGGTGCCAAGCGC  
TTTTTATCGACTTCCCTGGTGATGGACCTTTCGGCTTCTTCCAGGAGCCAATTCCGGATT  
TTGAGATTCTTTCTGGCGGCGTTGAGCAGCATCCCTCCCAGAATGATTTTCTGGCCGTTT  
TCCGTTTTTTCGACTCTGTTCCCGAAGGCGAGCCAGCCTAGCTTCTGCTTCGGCGATCTGC  
TGCTGTAAATTCTGGGCCATAGTGCTATCCTCCTGCGGTTGATCGAGCGTATATTATCAT  
GCACGGATGAGCGCAGCGAATACAGTAAATGCGCACTTACGACTTCTGCGAAGTCAAGCG  
CGCCCGGCGGGGCAGAAGCAAAAGCCGAAAGACGAGGAGCCGCGAATGGCCATCTATCAC  
GCCAGCACCAAACCGATAGCGCGCAGTGCGGGACGGTCCGCCGTGCGCCGCGGCGGCCTAT  
CGGGCGGGTGTGGAGCTGGTGGATGCGCGCACCGGGCTGGTCCACGACTACACCCGCAAG  
GGCGGTGTGAGCATACGGAGATCCTCACGCCGGACGGACTGGGTGCGGAGCGCAATGCC  
TTGTGGGATGCCGCCGAGTTGGCCGAGAAGCGCAAGGACGCCCGGACGGCCAGAGAGTGG  
ATCGTCGCCCTGCCCGCTGAACTCACTGCGGATCAGCGGAAGGATCTGGCCCGCGACTTT  
GGCCAATGCCTGGTAGCGCGTTATGGGGTGGCCGTGATTTTTCGATACACGCACCTGAC  
CGAGAGGGCGACCACCGGAACCACCATGCTCATATTCTCACTACCACCCGGCAGGTCAGT  
CGTGGCATCGACGGCGGATTGGTTATGGGTGCCAAGGCCCATATCGAGCTGTCCGACAAG  
GCCCCGCCGGGCCGCGCTTCTCGGTCCATTTTCGTCCGGACGATGCGCCGATCCTCTGTGCG  
GCGGACGAAGTGAAGGCCGTCCGTGCCCTTTGGGAGCGCACCGCCAATGCCGCGCTAGAG  
CGGGCTGGACTAAATGCGCGGATCGATGCCCGCAGTTTTTGAGGCGCAGGGCACCGACCGG  
GAGGCCACCCAGCATCTGGGGCCGGTCGCCTCCGAGATGGAGCGGCGCGGCAAGGCGTCC  
GACCGGGGAGATGGTAACCGGCAAGTCAGCGACAACAATAGGGAGCGGGCGCGACTGTCTG  
GCGGAGATCATCGACCTGCACGCCGAGCGGGAAAGGCGCGAGCGCCGGGAGGTTGCGCGG  
CGGGAGTTCGAGCAGAGTCACCGGGAACCTGCACCGGATCATCTGTCCGTACGCGGGCC  
GTGGCGGCTCTGGTAGCGACCCAGGCACAACGGGGCGCGGCAGGCCGCGCAAGACCGCTGG  
ACAGAACGGCGGCAGCAGCGGGCAACCCGGCGCGAGCGGGAGGCGCGGCGGGAACGCCTG  
GTGGCCCTGGCGGATGCTTTGGCGAAGGACAAGGCGTGCGGTCTGAGCATCCGGCAGGCG  
AGTCTGGATGCGGGATACCGGCTGCAGCGGCAGGGAGATAAAGAGGTCCTTGTCTATCCT  
CCCAACGACCTGCAGGCAGAGCGGAAGGAGGTTTCTCATGCCCGGCAGGCATGGGACCAG  
CGCAAGCAAGGTCTGGCGCGGGACCGTGCTACGGAGCAGGAAACCCGGCCTGGTATCCGG  
CATCCCACAAGCCCCGCTGGCAGGTGGAGCGGGAGCGCATCCTCACCCAGGCCTATAAC  
GCGGACGTGGCCGAGAAGATGGGCCGCTGGTATCGGGTGGAACGGCGGGCGGATGCGCTT  
GTGTTGAGCAATAAAGAGGCCACCGTGACCGACTACGGCGACCGCGTCACGTCCAGGGAC  
GGCAATGGGCGGGAGATCGAGGCCATGGTGGATCTGGCCCGAGCCAAGGGCTGGGAGCGG  
GTCAGTCTGACGGGCACGGCGGAGTTCCAGGAGCGGGCAGCGCGGGCCTTTGTGAGGCG  
GGCTTTGGGTTGGTGGACACCCAACCTGGAGCGGACGGCGCGGGATGCCATAGAGGCGGAT  
CGGCGAAAAACGGCCAGAGAGCAGGCCATGCGGGAGCGGGAAGCGGCGTTAGTCGAGCAG  
CAGGAGCGGGAGACCCGGCCCCGGCATCCGCCATGCTGACCGGAGCCAGTGGGCGGCGGAC  
CGCTCCCTGGTGCTGTCTCTCCAGTACGATAATCAGCATACGGAGCGGGCTGAGCAGCGT  
GGCTTTTATTGCCGATGGATGGAGGACGAGCAGGGGCTGCTGTATGAGCGCAGAAAAGAC  
GGCGCGACTTTTTATCGATCAAGGCCCGTCATCGTGGCGCCCCACGGCGCCGGACACCCA  
GAGAGGGACGCGATCGCGCTGGTTCTGTACGCACAAGGGGCTAAAAAGTGGGACTCCATC  
GAGATCACCGGCGACGAGACCTTCCGGCTGCGGGCGGCCATAGCGGCGGTAGAAGAGGGG  
CTGACGGTTACCGATTCTGAGCTTACGAAACGGGCGGAAGCTGTCATTGAACGGCGGGAG  
AGACTGGTGGTTCTGTGCGATGCTTTGGCGAAGGACTCTGCGTGCGGTCTTTCTATTTCG  
CAGGCGTATCTGGATGCGGGATACCAGCGGCAACAGCAGGGGGACAAATGGGTCTTTGTC  
TATCCTCATGACGACCTGCTGGCGGAGCGGAAGGCGGTTTTTACTGCCCGGCAGGCATGG

GACCAGCGCAAGCAGGAACAGAAGGAGAAGGTGCCGAGAGCGCAGATAAGCGCTTATGGA  
GCGGAGTATGGCCGCAGGGATGACTGGAAAGGGTCATTTACGGGAGCCGTGATTGCGGTG  
GATGAAGGCCATGTTTACGTCGGAGCGAAGGGTGGCGGTGGTGCGCCGCACTTTGTAGCG  
ATACCGAAGGAACGGTTTAAAACCCAACCATCGGTAGGGCTGTATGCGACGTTACCCAG  
GGGGATGGGCAGCGTCCGGCGGGCTGGAGCAAAGTGCTGGGGAAGATGAATGGGCAGGGG  
CGACTGGTGAGAGATCAGGGGAAAGGCCAGGGTATTGGCGATTAGCGAGGCCCGCCCCGC  
TGCCGAGGAGACCCCTATAGCGTTTCCAAATCGTGACCGGCCACGGGTCTCAAATCCG  
TGCTGGTAGCCCATGCCAAAACGAGAGGGATTTCATGAGAACGCGGAAGCCAGCAAAGGCA  
ATGGCTAGGTTCTCACAATGCGGAGCGTCTCAAAAACGGCGGTTTGTGAGAGCGTCATGA  
GGCACGAATCTCTATCTGGTCGTATTTCCCGCGGCAAGCTGCGGGGAATTTTATTGAGTC  
CACTGCTTACCACTGTTAGATCTAGGTTATGTTTAGTCTTCAAACAGCTTGAATAAACCA  
TATGCAATCGCCGCCACGACAGCAACAGGCGCTGCTGCGGTCATAATTGCACCAGCAGCC  
ATACCACCACCAACAGTCGAACCAATAGCAGCCATGCCAGAAGAAATAGCCGCTGCGCCA  
GCTGTACCAGATGCACCAGCGACGGAAGCTAAGGCTGCACCAGTTGTGCCTGCTGTTGCG  
GACATAATGGTTGCAGCTGAACCACCAACGACAGCCGACGCTGTGCTAGCTGCTGTACCT  
GCCGTTGCAATAGCACCAACGGACCCAGCCACAGTGGATGCTTTTACGTTGTCAGGCATA  
ACGTTTCTCCATTTTAGTTTAAGATAGGCCATGGGCCTTGTGAATATTATAGCTGTTGGC  
TTGATGGATGGGATAGACCTTCCTCATGCGCCCCCTACCCAGCGGAAAGCCTTGCCGCTG  
CTGGATCTCGGGTTCCTTATCGTGCGATTTATCTGAATTCTGAGGCGACCACTAGTCGAT  
GCAAGCGATGGCAAGAGTGTCAAACGGGCTTTCGAGAACACTTTGAGTTAAGGCTAACAT  
TCCACAGCGCATCACGATAGCTGGCTAATGATGCTCTGATCTTTCAACCAGCAAGGAGAA  
TCCAAATGAGCAAGGGTGGCAATGGCGGTGGCAATGGCGGTGGTGGTCGCAGTGGCGGAT  
CGCAAGGCGGTGGCGGGAAGGTGGTGGTTCCCTAGCGGTGGGCGCGGTCAAGGCAACG  
GTGGCGGTGGCCAAGCGGTACCGGCAATGCGTCTGGTGGCGGTGCGAGCAATGCGCCAT  
TTGGTGGTGGCAAAAATAAGGCAACCTGGCACCGGTGCTTGGACAACTCGTGTGCACA  
TGTGAAAACAAGGATTTTTGTGATGACAACTCTAGCAACGAGACAAAGAGAAATATCTGA  
TAGGGAAGGAGTAGATGTTATTTTCAAAGACAAGAATGGGCAAGTGGCAGATCCAAAAAC  
AAATGGGCTTCCTAAGTACCCTTATGATAAGGCAATTAAAGGATCAAAAACAGTAAACGA  
TCTTAAGAATGATAGACTGAGACCGAATTATACAGGCTATGATTTTGTATGTTCTTAAAGG  
TGACGGAACGGTGGCTGCTCCTCAAACCTACAATGGAACCGTTAGAGAGAGTTATCAAGA  
ACAATAAATTATTTAAGTAGTGGTCCCCGCGAATTCGGAATTTAAAGCACGTTAGTGC  
ACCAGGGGGTGGATTCCGTGTGAATCCGACCGAAACCGTGCCGTTTCGGATAGATTACACA  
CAGAATACGGTTCTTGACGCTTAGCGTACTTTAAAATCCGAATCCTGAAGGGACCCCGAG  
CACGCCGGTTTGGATTGCAAGCCGCTACAGTTAAGGCTCTGGACCAGAGATTCCAAAAAC  
AGGCGGGAGAAACCGGCTTCATCGATGATGATGCGCTTCTGGCCTATGCCGAAAAGATGT  
GCAGAGTGGCAGGCTCAATGAGTGAACGGCAGCATCACCTACCGCTTCAACAACGCGGTA  
AGCTGCTGCACATTGAGACCACCACCGGCCAAGCTCGCGCGCATTGGCTCAAAGGCTGCA  
AGCATGCGGCGATAACGTGCTTCGGTCGGATGATGTGAGTTCATATCACGCCCTTGAAG  
CGGCTGAAACGCTCCATCTCATCGACCAAGAAGCTGGCAATACTCATTTTGTGATTTC  
TGATTGCCGTCAAATCCAAGGAATTTACGTTGGTGGCTTCGGCCATAATGGCGGCTTTC  
TGCTCATGGTTGAGCCGTTTCGTAGGCTTCCTCAACGAAAGACCACATATCGAGAATATCG  
ACAACATAGGACACATCTTGCGGGTTCGTCCACATGATCGTGAAAAACCCCTGCATATCC  
CACTTGGGAGCCAGTAGTGCCCTCCGTAGATGACCTTGGCCAGGAAATTCGGGTTTGAG  
TCATGGTTCTCGATATTGAGCGCCTTGAACAAGTCGCCCATCATCAAGATGAGCATCTTT  
TCGCCGTCGCTGAAGCGCACAGCGCGGCTTGACCCGCTGATAGCCCAAGGTTAACTAGC  
CTGCGTACAGCTTCAGCCCGTGTGGTTGGTTGGTTTGGCTCGCTGGCCATTTATCAACC  
CTAGATAGTTGCTCTTCATCTATTCGAGTTTCGAACCGCTCAGATTTTGTGTCATTCCG  
TATACCTCTCGTAAGTTACGTACATACGTACGTTTATATACATATTATGTACGTAATGCA

AGCTCCGATTTATGGGAATGAACCGGTCCTTTTGGAGCTGCGCGCTAGGCCAAAAGCTAGA  
 TTTCTGCTGTGGATTTTGCCTGGCGCGGTTTGTAGTGTACAATATGCACATATTGTACAC  
 TTTATGGGGGTAAAGGCTATGAACCACACGAGCATATCCGACTTTCGCGAGCAGGATTAGCG  
 ATTATCTCGGCAATCTCAGCAGTGCGCCCGTTGTCTTGGAGCGCCACGGCAAGCCTGCAG  
 CGGTGGTTTTATCCTATGCCGAGTATCAGCACCTCCAGGACCTGGAAGACGCCTGGTGGG  
 GAGAGCGGGCGCAAGCGGCGCTGGAGAGTGGCTTGGTGGGGCATGAGGAGGCCATGCAGT  
 ACCTGCAAGGGAAGCTGGATGCGGCGTCTTGAACGTGACACGGGATGTTTTGAAGTTTTTG  
 GATGGGTTGCCGCCCAAACAGTTCAAGCAAGTAGCGGCCTCGATGCTGGACTTGCTTCGG  
 AATCCAGAGCCACATGACGCACGTCCGCTGAAGGGGTATAGCTATCGTCGGGTGGACGTT  
 GGGGAGTACCGCATCGTTTATGACTTGCCGGAGGATATGGTGCCTGTGCTGCTGATTGGA  
 AAGCGTAACGATGACGCGGTGTACAAAGACCTGGGCCGGAAATAGAGGGGTTTACCGGAC  
 GCTGAAAACCTGGACGGGTTGTTGGACAAAATCAGGGAAGGTCGTTTTCTCTACGCCCATC  
 GTCTTCTCCCTACCAGACAACAAGCTTTAATCCGAAATATGAGGACCGTAATGGTTTTCAT  
 GCGGGCGGATAAACACTCAATAACTTGCAAATCATCTGCGAGCGTTGGATCAACGGTGTAC  
 TGATACTCTTGGAGGTAAACACTGTGCTCGTTCGGGCCGCTGATGATAGCTCCCTAGCCT  
 CTGCTAACTAGCGCCATTCTTGTGCTTCGGTGACTTCGCTTAGTGCCGCGTGTGCGCATGT  
 GTTACCGTGAGGCCCTAACGCTTGAGTTAGGCTACCGTTGATGTGACTCGTTGAATAATTC  
 TGTGAGGATCAGTTTCGCAACGCCTTCTGCGGCTGGTCCACCATGTGTGCTTTTTGTACC  
 ACCGCCATCCATGCGCACAGTCATCCAATCGCCATTGTGCGATGCTGTAGGCACCCGCTAC  
 CTCCGTCCCACAAACGACAACCTTTGATGGGAGACCAGGACACTGGTTCTTTATGTTTTGC  
 CATGCTAGATCTCCGCCAGGTCGGTTTTTGTTCGTGTGAACGCCTTAAAGGATAATGTAAA  
 TTGTACTGTACTGTAAAAATGATCTATAGTACATAATAACTTGGGATTCTCAAAGTCTAT  
 CGGATGAGCGGTCCAGTAAATATGCGACACAATTCTTCAAATTGTCTTGTGCTGTCTTTT  
 TTGCGCTTCAGAATTATAACAGCCGTTTACTTTTTATCATTTAAAGCCTGTAATTAATTT  
 TCTTATAGATTGTTTTTTTTGTTGTTCCAAGTGGAACATAGTCATGGTAAGTTGTTGGTA  
 CTTTTCAAACAGAAAGGCAACTCGGTCAGCATCGCCGATAAACTTCCTTCTTCCATAAGC  
 TGCATCAACAGCACGATCTAGAGCGTGATGAGTCTGCACCAATGCTGGCGGCATGGCTAA  
 TGGATCGTAGATATCTGCTAATGATGATTCCGGGAATTGTGCCCGTGCATCCAAGACTGA  
 TTGCG

### 10.3 Anexo 3

#### Secuencia del plásmido pAfPQ510-3

>pAfPQ510-3

TCAGCGTCCTACCACTATTATCGAATAAGTCGAGTAATTGATTGTTTTTCATTCATACTTG  
 AAGACTCTGTCGTTTCAGCGTTTGTGATGCCATAGGGTTATGCTTATGAAAAATTGCTACT  
 CATAGTATTCAAATATCACCTATCTGTCAATGATGAACACACGCTTCAACACGCTGACAA  
 GACTGTCCAACCTGAACGTTTATATGGCCATGATCGGCCTATGGAGCGAAATTTGAAAGC  
 CATCTCAAGTGGTCAGAAGAATGACCTACATGACAGTCAACACGGAAATGATTAACATAA  
 CAGTTAACTCGTGCGTTGCATGATAACGCCGCGCAGAATTGGTTGCTTTTACGTTATGTC  
 ACTCGCAGTCACCACAGCCTCTGAATAAGGAGAAAGAAATGAGTCTCATAGCAACTGGCT  
 GGAAAAATGTAGGCGGCACTACCGACAGAGCATGTAAATGCGGCACATGGAAACAACATT  
 GGCTCAACTTTTTCAAAGAAAACCTTGGCCAACGAGTTGTTTCGGTGGACAATTGCTTCAATA  
 AGCCGACACTCGGAGCACACGTTATAAATCCTAGAGAATCCGGTGAAAGGATCGTGCCTA  
 TGTGTGACTCATGCAATAAACTCAGTAACCCATTTTTCCTTAAAAAATGGAGTTACCTTAC  
 TAAGTGCCAATAAATCAGAAACTTGCGAAAAAAAATCATAACCAAGCGGTTGAGCATGAC  
 GCCGAAAATAGCGATGCAACGCAATTTATAGGAAGTGTCTCATTGACGTTGCAATCT  
 TTATTACCGACAATCGGTGAGCTGCATTTTGTATGCGGCAATTAGGAGGTGCACCACGAAT  
 ATAATATCGCGGAAAGCCCAAACGATCAGGCTGATAAAACACTTACGATCTCATTAAGGC

CTGGTGCCACCGTCCTAGGGATAGCGCGCCGAGACGCAGGGCGGGATGTAGGGTAGATC  
GAGTCGAAAGTCCAGGCTGTCATCCGGCCCCAAAAAGCCATTGTAAAAATGGCTTTTTTG  
TTACGGTAACAGCCATGATTACAGTCCACCAGATTGATAATCCGCTGGTCCGACCAGCAC  
CGAATCCCGTATCCATGCGGGTTTGCGATCTTTGAATAGGGCAGATCTGGCCGCTGCGCC  
CAAAATGCGCCCCAAGTTCGCCCCGAAAAACCTATCTGCAACTAGTCACAATAATAAACCG  
TTACGCAGTAACTAACAGGGGAGGCGTTACAGCACCGCAAGCATCCCCACACCAGATCAG  
GACCATCCTGTTTATATCTGGTTCGATAAGCCAGCTTTGATGAAAACCTTTCTGAACAACC  
CTTATGGATGAAAGCCGCTGTAACCTTGATTTTTCTTCTTTTTCTGATTCTTTATCGATAA  
GAGATATTGCATTCTCAACATTTTCTGCGTGACAAATGAAATCACATCCTGGCAATCTTA  
TAATGATAAAAGAGGTAGATTTTTCTCCTTAAAAAACCATCTTCTTCGAAGACTTCAAAGA  
TTTCTAGGACTGCATAATTACCACGCTTGTCATATAGACTTGTAGAGCTTCTATTCTCA  
TAATTCTGCACCTTTATATTTCGTTTTACGAAAAATACTATGGAGTACAAGACCCATCATA  
CCCACCTTCCACACAAATCTCACCACCCCATTCAGACCCCAGCCCACGTGCCACGCTTC  
GCGCCAATTCCACCGCTTTCTCTATGGCTTCCCGGACCCTTCGCTCCACTGTGTCTGCCA  
GGCCTTTAATTGCGTCTCCAAGTGATGCTGATCGCGCTCCATGTCGTCCAATCGCTCCAT  
CAAGCTGCTGTGCATCGTTCCGGTATCCGCCAAGAGCGCCGATAAGCTGTCCATCCGCTT  
TGATAACACCTGATAGTTCCCGGTCATATCGGTCAACCGTTTCTCCAAGCCTTCCACTTG  
CTGACTCAAGCGCTGCAACACTTGCACCAAACGCGTCTCTAATTCGGTCATGGGCTTCCT  
GCTCCTCTATTGTGCGATTTCTACGGCGTCTTCTTTTTGGCCGTGGACGGTGTGCGTCAT  
CCGGTTGTAGTGGATCCGGGGGGCGATCAGGTACCACTTCCCGCCGCTCTGGATCACGTG  
GAACGGCGGGCGGTAGCTTTTTTCAGCGCGGCTTTGATCGTTTGCTGCTTTTTCTCCAGCCC  
CTGTAACCTGCTGCCATTGCCAACTCGCGTACAGGCCCAATCCGATCAGCATCCCCAGGGT  
CAGTACCGCGCCCGTCACCAGGCTGACGATCCACATCCATACCGACAGCTTCCCGATCTT  
CTTCAACTGCTTTTTCGATATCGCCGATGGTTGTATCCAGCCCTTCTTTCAAGCGCTGCGT  
CGAATCGTCCGCGAGCTTGTCGAGCTTCTCTTTTCGTCTGATTACGATCTCTTGATGGTC  
CTGCTCGATCTTGCTGCTCAGCTTGCTGCCCAAGTTTCGCGGCATGCTTCGGGGGTAAAGT  
CGGCTCCATATAAGGCTCCCTTTAAGCGGTATTTCTTCCCCGTGTCCGGGTCCCTGAATAC  
TGAGATAGTCTTTGCCCTGCCGATTGACCGCTAAACCCGCTTCTTCCAGGGCTTGACGA  
TGTCTTGACGGTTCTGTATCAATCCGGCTTCCAGCCGTTGCACCAGATAGCCGGTCACCA  
GGGCTTTGGGGTCCGGCTCGATCTCCAGACCGGCACGCAGTGCTGAGGCTTCCATCAGGG  
CACCATGCCCCGGTTGGTAAAGCCGCGCTCGTAAGGGGTATCCGGCCGTGCCAGCCCT  
TTTCCCAGTTCCAGGCATCCCGTAGGGGATCAAAGGTCTGTTGCCAGCCTGGCGGGGCGG  
GGTTGTAGCTTTTACCCGTGGCCAGGTCCACACGGGCGCCAGCAGATGCACATGGCAGC  
CGCCGTTGGATTCTCGATGCAGGACGGCTGTCCAGGCTATCCGTGTGGATCGTCCAGAC  
CGGCCGTAAAAACCGTTTCGACGTCATCCAGTACCCCGGAAATATCGGCATCCGTGGGT  
GATCCTCCGGCGCCCAGGAAACGACGCGGAACTGTAGCGATGCACGAAGTCCAGGTTAT  
CGGCGACCTTGGCCACCAGCTGCGGGTTACCCCGCAATACGGTGACTTCGGCCCGGTCCA  
GACCTTGATGGTCTGGTCCGCCAGCAGATAGGCGACCGCACCGTCCGTACTGCCGGTGC  
CGTGATTACAGGAACCTTGATGTGCATGTGTCCAAAATCTCCTGAAGTCGCCGTTTCGGTTTC  
GACCAGCATCACCAGAATGGCGCTGGTGAAACGTCCACGTCTCGGCTGTTTCAGGGAACG  
GGCAATTTGGTTGAGGTTGTTGCCGGCATTGGCGACGGCGCGGACCAGTAAGGGGTCTAC  
TGGGACTACTGTACGCAACTTGGAATCTTCCGGGGAGGAAGCTTGGGGTGATAATCGG  
GACCTTGCCGCCTACCGATACCTGCGACCGTACCCAGTCGGAAGCGATAGGCCGGCGGC  
CTCGGCGGCGGATCGCCAGGCGTCCGCGACCGCTGCCGGTAGGCGGAATGATAGGCGCTG  
GTCGAGAACGGTCTCTGGGGGCATCGGGTACTCCTCGATATTGCCGCTTTTCGGGGGTCA  
AGGGGGCGGCGCCCCCTTGCCAGTCTCCGGCGGATATGACGGCCCCCTTGGGGGCGGAAAT  
GTCCGACGGGTAGGCTGGCTATTAAGTTCGGCTTAAATATAGCGCGGCGACTCTGGAT  
AAACAAGCGGTTGTGCTCGGGATTCAATCTGGATACCACGGGTCCGTTGGGCAGGAATCT  
TGTTTGCCGGGATCGGGCTGCATCCATAAAATGGGCGCCATGGATAAACTCGCTATTCAG  
GACCGGGACCGCATTTCTCAGTGTCTCCACGCAACGCCTATGACCGTGGCAGCAATCAGC  
AAGCAGCTACATCTCAGTACCGCCCGTGTCCGTGGGATCATCCAAATCCTGGCAAACAGC  
CACCAGATACACGCGCCACGTTGTACCACCGGACCCAATGGAAACCCGGTGAACCTCTGG  
GAAATCCATCCGTCTCTGAAAGCTCCGGAATGAAGGCCTCGGCCCAGAAAGTCGCGGCGT  
AGCTTTCTGCGGATAGGCGTCCAACAGGGGGATGTAAGCCCAAACCGCCGAAATTTCCGT  
CTGTATCGCCTTAAGGTGTTTTCTACCGTAAGACGAGTCCACGGTGTATATGTGTTTACA  
TCTATTTGGCACCCCTCATTCTGATTCTATCTTAACGAACGTCAAGATCATAACAGTAGGAT

TTTCATTGGGTTACGCTGTAGGCGGAATTTTCGGCGGTTTGGGCTTACACCCCCAACAGA  
TAATTCAGACAACATTCAATTGTTACCGTAACGGGGCAATGTACTCGCCCCGCCGCTGG  
CCAACCAGGACATAGGGATTTTGTAGACCAGAGCCGTCATGTTGACGGCAGCCCCGCACGT  
CGCATCAGTTCCTTGAGCAATCCCTGCAAGATAGCGCTTTGTCCTGGATAGTCTCGCGCC  
TTGCGATAAGCGATGCCGATCTGTTCCAGTAACGCCGTATCGGACAACCTGGGACTCATCA  
GAATCCGCGCCCCAGACCAGAGCATGATCTCTTTCCCGCTTGCCTCGTTGTCGTTCCGCA  
TTAGTTTGCACCATGATCTCCTATCCGATCCGTTACGGTAACAGAAGCCTACACCGTGAC  
AGTAACGGTTGCAAGGTGGCTTCACAAAGTGACCTTGTGAAGCACAGCAGAACCAGAGGG  
AGAATCCCGCCTTAAAGGCCCGTATTTGTCTTAAACAGACGCAAATTTTCATTCTGGTA  
CATTCCCATCACCAAGCTACCAAAAACGCGTTCTGCGCCAAATTTACCCGCTTTTTTGAA  
AACTGGCGGGGAGCCGCTGCCGTAGGCAGTGGGGACGCAGTCCCCATAGGGGTTCGAT  
CCGGCGAGCCGTAGGCGAGGACAGGGGGACCAGCAGGGGCCCCGCCGGGGATGTTTGC  
CCGGCGCCGTAGGCGGCAAGTGGGCGCTCATTATTGAATGCTATGCCACTGTTTGC  
CGCTATGCCACTGTAAAAAATCTGGTGGTACTCCATTTGCGCTTTTCAAAAGTTATCCAC  
AGGCAAGATCTGGTAGAAAAAAGGTAGAAAAAAGGTAGAAAGGAAAAAATGCCATTTT  
TTCAATAACATCAATTAGTTGTATTGGCCATGTGGAATGCTATACCGATAAAGCGGAATG  
CTATACCGATAAAGCGGAATGCTATACCGATGGCGGCGGAATGCTATACCGATGGCGGCA  
TCCACAAGGAAAGCTGCGGCTTGCCCTTAGTACTGTCTCGATTTTGTGTGCAGTGATGA  
CATCTAGTCGTTCCAGTTCGTTGCAGGCTGCGTCCAGTGCTTTTCTGAACTTTCGCATTG  
GACTAACGTACTCCATCTTGGCTTTAAGCCAGTCCAATGCATACCACTGCACCGAGTCTG  
CAGATGTAGCCACTAGCCGCTGCAAGTTTTAGCCATATCCTGTCCACGTCCGATTTGCA  
TCCGTTTGTCCCAGTCGATCAAACGTATTCTCGGTTACCGAACATCTGTACCCAGCGCG  
GATCTAAGCTATAGCTATAGGTTTCGCCCTCGTCGTCGTAACCTGAATCCCATAACGATGC  
GAAAAGATACCGTTTTGCCGATACTGTATCGGGTCGAGCCATCAGGCTTCTTGGCCTCAA  
GGAACAGGGTAGCCTCTGTTCAGCGCCTTTATACGCCGATGCAGCCATTCGTATTGCTGTT  
TGCCTGTCCCGCGTTCGAGTTTGCGAAGCAGTTCAGCGCGGTTGAGCGGTACGGAAGCGC  
CAACTGGGAATGGTTGGGCGAAGGCAATCAACGCCATGATGAGGTGCGCGTCAGCCTCAT  
CCAGTTGTTCCCCTGTGTACTCCAGCACGCAATCCTTGCGCGTTACCATCGCAGCTTGT  
GATGAACTTTTCGACGCCCACGAGCGATAGGCGCGATGAGACTAGAGCGGTTGATGTT  
TAGGGAACGCCCTATGTCAAACCCGGCAAAAACATTTGGCGCGGCGTCTCGGCTGCCT  
CTTGTTCGCGCTGTACTACCGCTTCCGCGCTTTTTGCCTGACCCATTCAAACGGATCAC  
GCCGCTTTTTGGTCTCTCTGTTTTTCAGCCGTTTTTCGATGGTTTTATTGCTCAACCTTGGG  
CCATTGTTGCGCCCCGTGTAAAAATCGAATCACTTGGACCTCGCCCGCTTCATCTGAAT  
CCGGTACACCACGATAAAGGGCGTACCAGATACCACCAGCTCACGGGTGCTGCGCACGCG  
TCCAGCCCGTCCCATCCTTGGGAAAGTGCCAGCCGAGCAACCGCGCTGGTAATGGTTGC  
GTCTGTCTAGCGCGGCTGCGGCTGTCCGCCGCCACAAACGCCATTGCATCTGATA  
TTGCTGCCATGCAGTAGCGGACCACTTCACCACAAACGGCAATACCCATTTTCTGCTGTT  
CATGAATCGCCGTTTTTCGGTTTGCCTGACAAGGTCAGCGCGCCACTGTGCGCGGTGCGCG  
TCGACGATTTCATGGGGAATCCACTGCGTAGCCGGGTCATCGGCTTCTTTTCAGCCCCATT  
TCGACCTGTTCCCGAAACAGCGGTCATGCTCGGCAGCGGCAAAAGCGTTCCGCATCCGT  
TCAGCGGCATCCGGTCGGGATTTGCCGGGGAGGACGCTTTTCGGCATCGTGTGAGTGGCG  
TCCAACAGATCCACCTTGACGATACGCAGTTCATCCCGGAGATACCCGACACAGTATCA  
AGGCTGCGCCAGAGACGGGGCTTGTGCGCGCGCTGAATCCCCAGCGGTCTTTCTTCCGTG  
CCGTACTTGAGCATGATCGACCAGCCACCCGGCTGACCGATAATGGCGGCGCCCCGGAGA  
GCGCGGGCTTCGACCAGGCGCTTGACGGTGGCTGTGTGATGGTGTGCGTAGTCATTTTT  
TGGTAATCCTCGTAACGACCATTGAAAAAGTCACTATACTCTGCATTACTGATAATTT  
TGCAAGCCTGCATCGAATGTACCGGATAAAGACTTCACATAAAATCCGTTATCGGAATGG  
CGGAGGCTTTTTTCCAGTCTCTCCAGAAGTAGTCGCTATCAGCCCGACACAAAGCCGATA  
ACCCGCTTCTTGGCTTATGAAACAGGTTATAGTACATCGTGTGAACAATGTATTACATAA  
CAGAGGACATCCTGTGACACTCGTCAGCATCTCCGAAGCGGCCCCGCCTCACCAGGCGCAG  
TAGAACGACCATATATCGTTATCGTGATGAGGGAAAAATCAGCATCTCTTCAGACCATCA  
AGGGAATCCGATGATAGACACTTCGGAGCTTATGCGCGTTTTTGGCCCCAATACTCTGGA  
CATAACAGGACATTCACATGAACAGCATGATGAACATTGTGTAACAGATGAAAATGACAC  
CGTACACCCCGGTAACAACAGCGCAAGCCTGGCTACAGGGCCAAATGGAGCGATT  
AACCGTTCTACTGACACATGCCAACCCACCCAGCCAAGCGCCACATGCGCCGTGGTGAA

GTTCTGGTCGCAATAAAGCCAAAATCCATCTATTCTCGAAGCCATATGTGAGAGAGGGCT  
GCACATGACTACGGAAAACAACACAGAAAATCTTGTTCTGGAACACTTGCGATCAATACG  
CAATGATATTACCGCATTTTCGTAGCGAGACGCGGCAGAGATGAATAATGTTAAGCATCGT  
TTGGGGCGGATCGAGGAACAAATTGTCGGATTGCGGTTGGATATCGTCGGTGCCTAAGAG  
GATACCTATCGCCAGCAAAACCGTATTGACGAGATCGTTACGCGCATAGACCGCATCGAG  
CGCCGTTTGGAAACGGTCCTGAGCATACTCGGCCCTCAAATCAGGGAGACAAACCATGGCA  
GAAGAAATCGAAAACCTCATGCTGGAACACTTGAAACGCTTTCAGTCCATACTGGATCGC  
GTCGAACGCAAACTGGACGACCTAACCCGTCGCGTCGGTAATCTGGAATCAGGGCAAGCC  
AATATCATCCAGCATTTAGGGACGTTGGCCCGCGCTGATGCTCAGCAGCAGCTCACATCG  
GATGGATTCAACCAACGGCTTGAGCGTATCGAGCGCCGCTGGAACCTGCTGAGCCGGC  
AAAAATAATCGGCTCCTGCTTTTTGTCTCATAACAGCCCAATTCAGGCAGGAGCCGGGTC  
CATCTCAATCAACGGCCTATGGGCCTGGCTAGCCCTACTCACGAGACAGAATGATGCATT  
CTGTCTCAACCTGTAGGAAGATCACCCCATGATATCTGACTACCCCTTTGTTACACTGTG  
CCGATAGCCGTCTAATTTACATTATGTGCTCTAGCATCGGTATCGACCGTCCATGATCTT  
CCTCAGCCACACACGCGCAGACAAACCCGTAGTAGAAGTAATAGCCCAACGCTTAGCAGC  
GGTTTTCGGGCAAGAGAACGTATTCTACGACAGTTGGTCGATCCAGCCGGGCGATGGAAT  
TATAGACAAGATGAACGCTGGTTTGACGGAGTGTAGATTCTTCTTTTTATTTGTCAGCAA  
GCAAAGCACCCCTGAGCGGTATGGTAAAGCTTGAGTGGCAGAACGCCTTGCTGAAAAGCAC  
GAAAGGTGAAACAAAGATCATCCAGTGCGGCTAGATGATGTTCTGCTTCCAGCTGTTCT  
CTTGACAGACACTTTATATCGACCTATTTACGCAAGGTTTAGAAACAGGTGTCGGGCAAAAT  
GATTGACGTTACCTCCGGGCGGAGTACATATCGATCGAGTGCTGATCCTTCGTTCCAGAA  
TGTCGGTGCTTATCTGTGCGGAATTCGGGGAGCAATCACCGTCGAGTTTCGGGCAGAGGT  
GTACATGGAACCACTCCAGATATTTGGTTCTTCTCGGGAACACAAAAGACGAGGTGTC  
ATGGAGCGCTATCAGGGAAGGACAGTATGAGAGCGGGTTCAAGAGCAATATTTTCGCTTGA  
TGATGGTCGGGTCGTGAATGGGCTACTTATGGCCCGTCATTCCGCAACGTCGCCAGGTTT  
TCCATTCAATTACCGAGGTTAAATCCAAAACCTGGCACAGAGATAAAAGTCCTTGCGCGCAAT  
GCGCTTTGCTGCTCACGATCAATTAACCAGCATTCCTGTCAATTGAGCATGAAGCACACAA  
CACTGCCTTCAGCTGAAGGCGACGTTATTTTTTGGTTACGCCATGACTAAGAATTTGAAG  
ATTGAGTTTCTACCCAAGGCTGGAAGCAGCTCCTTACATCGAGAAAAGAGATGCTTGAT  
GCCTATGACAGAGCGCGAGAAAAAGCCAAGTCGCACGAAGTTGAAACCTTTCACGGAAAG  
GTCGCAGAGGCCGAATTTAGGAAGTGGCTCTCAAGCTTCTCCCAAAGCGGTATGGCGTT  
ACGTCAGGGTACATCGTTTTCGCCCGGTTTAAAAAGCACAGATAAGACGCCACACTTCGAT  
GTAATTATTTACGACCAGCTTGATTGCGCTATTCTTTGGGTTGAGGATTCTCCGGATGTT  
TCATCACCAGGACGTTGCTCGCTATTCTGTTGAGTACGTTGCTTGCCTTGAAGTA  
AAATCTAGCTTTTCGTCTACTTCGGTCGGTGAAGCAATCGAGCATTTGAAAGATCTATTA  
CCCTTGATGAGTGGTCCTGATGAGCCACAGGAGAAATACAACTTCATCTTCCGTCTTCT  
TTTTGCTGCGGACTCGTCTTTTTTGGAGCTTCGACAGGTTGACCAATACAGCGAGTCTGCG  
ATGAATAAATTGATTTTCAGCTATTTCAGTTACGTAATTTTTTGGGTGGCATCATTCTACGT  
GGCGAGGGACATATCAATGGCACAACAGGGAAATTGTCTTACTTCGCTCCGAAACGCCG  
ATTAACAGTTTCGATCGGCAAAAACAAGAATTTCGTTACTCAATCTTGGCATGTGCGAGTCA  
GTTAAAGTCGCAGATACTCTTTACCTTAATTCGATGTTGATGTGGATGGAACCTTACTTC  
TCTCAGTTTCGGTTTTGATCTCATAGCGATGATGCAAGGCACCTATGAGGTAGGGCGCCTT  
TCAAGTTTTTATGGAATGGGGACTTCAGAATGGGACCATCGGCGTCTGTCAAGGTAGATA  
CCGTCATCTATTTCTTAAGTGACCTTTTTATCCTGCCGCTGTGGGTTTCAGATTTACCGCA  
CCGATCGGTGTCCAATTGCGTGTGCGGCCTGACCAGCGCCCTGGATTTCTCGCCTTAGCC  
GCCTCATAGAGGTCATGGCGCTTCGTGAGCAGTGCATAATCCTCGCCCCGGTGAGGATGG  
GCGGAGGCTGCGTTATAAATAGTACCAGTTATATCTTACCTCCAATCTCCGTAAACGACG  
CGCGCTTATGCTACCTATAGTCTGTGCGCTTATAGTCGTCATTTATGGACAATATCAGCC  
TGATACGTTAGGGCTTGAGCATGGTCAGAAAAATCGAGCGACTCTCTCCGCGCTGTATTAG  
CTGAGAACATCAAACTTTTCGTGAGAAAAAGGGTTTTTCCCAAGAGGAGCTGGCAGAGC  
GATGCGGTTTTGCACCGCACATACATTGGCTCAGTTGAGCGCCACGAAAGAAACGTACAC  
TCAGCACGCTTGAGGTTTTGGCCGCACTTTGGGCGTAACAGTTCCAGAGTTGCTTATGA  
GTGCGAAAGCCCATCGAATAACGAACAGAAGGGAAGGCTTGAGTGATCCTTTCTGAAAAA  
GAAATTCGCGAAATAGTTGAGACGCTACGCCGACTTACTCCGACGCAACAGGATTTGGTC  
AAATCTATAATTCGTGCGTTTCGGGTCTGACTATCAATTTGATCGCGCTCCAGATTCGGAT  
GTAGTAACAGATACCGTCCTAGCTTCCCTTGGTGATCGGTTGTTGAGCCACCACGCGGG

AGTAGACAGGCCCTGAGTAAAGATCGATTTCGAGTTTGCGTTTGAGTCCGCATTAAACGCG  
TCCGGCATTACGGCCCAACTCGTGAAAAGCCGGACGAACCGAGGTCACGATATTACCATT  
CGAGGAATTCCGGTCAGCCTCAAGACAGAAGCAGCAGCCAATATCAGCGACGAATCAATA  
CACGTCAGCAAGTGGATGGAGCTTGGTCGGGGCGAATGGAAGTTGCCTCTGCTTCTGGAT  
TTGTTCTTGAACACATGCAAAGCTATGATCGTATCTTCACGCTCCGGCGGCTAAAAGAT  
AACGGGACCAATATCCGCTATGAACTTGTTCGAGATTCCCAAAGAACTTCTGCTCGAAGCG  
GCGAGCTGTGAACTAGAGGTATGTGCCAACAGCCGACAAAACCCTCAGCCCGGCTACGGC  
TATGTCAAGGACACAAATGGACTGCTCAAGTACTCGCTGTATTTTCGATGGGGGCACAGAG  
CGTAAGCTCCAGATCAAACACCTGCGAAAAGACCTTTGCAAGGTACATGCGCGGTGGATT  
TTTGGCTCAGCGCCCGCGTGATAAACGCTCGCGCGCTAGATCTGCATACTCCTCATTTCAG  
TTCAATACCAACACACTCCCTGCCAGTTTCATTACAAACAACGCCAGTAGTTCCCTGACCC  
AAAGAACGGGTCTAGCACCCGGCCATTCTCACGGGAACCTGCCGCCACACAGAGGCGGAC  
AAGAGCGCGCGGATAAACCGCAAAATGACCGCCAGGATAAGGCTCAGTATTAATGTTCCA  
AACGGTGCGCCTGTTCTTTGACTTCTGTTTCTGGTCCGCCGAGGCTCCATGATCGCCTG  
CCAGTCGTAGTAATACTTCTCCGACTTGGAAAATAAAAACACATACTCATGAGAACGAGT  
TGGACGATCCTTAACACTTTCAGGCTGGCAATTTGGTTTGTTCAGATCACGTCCGTACG  
CAGATACCAACCATCTTCTGAAGAGCAAACGCCAACCGCCAAGGAACGCCAATCAAGTC  
TTTCGACTTCAAACCGTCGGGCGTTGGGGCGCGATAGGCCATTGCCCGTCCCTTATTCTT  
CGAGTCAGCATCCCGCCAAGTCCGACCCCGAGATGTATAGCTGTACCAATATTTCAGCCA  
CAAAGTGCCTCCATCAACGAGGGTGCGCCGAACCCCTCGGAACAGGCGCACAAAGGTCTGC  
AACATACTCATCAACCGTAATTTCTGCACCTATCTGCCCGTCGATGCCGTAATCCCTCAA  
TCCCCAGTACGGTGGCGAAGTCACAGCGCAATCAAATGCCCTTCGGGCATCTCGCGCAA  
GATTTCGACGCGCATCACCCACGATAATTTTCGACGCGATTTCGTGGCTCTCTCGGCTAGTTG  
AGTCC

#### 10.4 Anexo 4

##### Secuencia del plásmido pAfPQ506-1

>pAfPQ506-1

GAGTCATGAGTTGCTCTACGTTCAATTTTCGTCTACTCCTCTCTGCTCTATGCTTATCGGTC  
CATCGGGTCCGATCACCACGGTCACGACGCCAGATTTCAGGAGCGATCGCAAGCGGTCTAT  
GCCCACCGGCTCCTCTGCCTGCATGGGTACCAGGGCGATGCGTTTGGCGTAGCGGGTACG  
AACCGCCTCGATCTGGGCTACCTCCAGCGCGGCGCGCTGCTTCAGCAGGGGGGACGTAGT  
AGGCGCCGCCGCGCAGGCTGTTGTTGATGACCCAGGCCCACGGCTCGATGCCTGCACGACG  
CAGATCTTCTGCAACTGCGCGGCCTCCAGGACCGGAGTGGGTTCCGGCAGGGTTCACGAT  
CAACACCATCGTCCGTTCCGGGTCTGCAACTGCATCATCGGCGTCGTGTAATGCACCTG  
CGGATCGACGAGGTGGCGGGTCACTTCGTGATGATAGGCCCGGTGGCGTCCAGCAGCAG  
CAGGGTATGCCCGGTGCGGTGCGGTGCCATCACACGAATTGCTTGCCGGACTCACGGAT  
GACGCGCGAGAACGCCTGGAACACCGCGATTTCTTCCGTGCAAGGCGAACGCAAGTCTTC  
TTCCAGCATGGCACGGCCTTCGGCATCCAGGTCTTGGCCTTTGGTGTCCAGCACCTGTTG  
GCGATAACGCTCGGTCTCCAGCTCCGGGTCAATGCGGCTGACTTCCAGATTGCCCAGCGA  
ACCGGCCAGCGTGTGCGACAGATGTGCGGCGGGGTGCGAAGTGGTCAGGTGAACGGGCAG  
GCCACGTTTCGGCCAGCGCCACCGCCACTGCAGCCGCCAGGGTGGTTTTGCCGACTCCGCC  
CTTGCCCATCATCATGATCAGGCCGTGACCCGTTCCAGCGATCGCTTCAACCAGCGTCGA  
CAACTGCGGAAGGTCAACGCATTTGGCGGGCGCACCGCTACTGGCGGGGGCGCTCTCGTT  
TTGATCAGAGAACAGACTGCACAGCGCCTCGACGCCGACCATATTGAATGCCTTGAGCGG  
CAATTGATCGACAGGCAGGTGCGCGAGCGCGGCGGACATGCTGGCTATGGACGCCTGTTT  
GCGGTGCCGTATGGCAGCGGCCAGCGCGTCTAGGCGGCTTCCTCTGCCGGCAGCACACC  
GTTGATGACCAGTTCTGCCGGGTGAGGCCGTTAGCAGCCAGTTTCCTGGTGGGTGCGTGC  
GACCTCGTCCAGCGTGGTTTTCTGCGCGCGGGCGACCAAGTATCAGGCGCGTGCCTTCGGG  
ATCGGATAGCGCTTGACCGCTTCGGCATAGCGCTGGCGTTGCTTTTCCAAGCCCGCCAG  
TGGACCAAGGCACGACGCGCCTTCCGGATTTTCTCAATAAAGCCGCTCCACGCGCCGGA  
CAATTGCAACAGGCGGATGGTATGGCCAGTCGGCGCCGTATCGAAGATGATGTGATCATA

GTCGGACGTCAGTGTGCGCATCGGTGAGCAAAGCGGTGAATTCGTGCAAGGCCGCGATTTC  
CGTGGTGAGGCTCCGAAAGCTGTTCTTCGATGCCTTTGACCACGTCGTCCGGCAGAGC  
GCCGCGCACTGGACCCACGAGGCGCTCTCGGTACTGTTGTGCCGCTGTTGCGGATCGAT  
TTCCAGGGCGAATAGCCCCGGGTACCGTAGAAATGGCCGTGATTTTGTTCCTGATTTCCTG  
ACTGAATACCTGACCGACGTTGGACGCAGGGTCGGTGCTCACCAGCAAGACCTTCTTGCC  
CAATCGAACCAGATGGATGGCCGTGGCACAGGACAGCGACGTTTTTACCAACGCCACCCTT  
GCCGGTGAAAAACAGAAAGGTGGGTGGGTTTTGTAGGAAAAGCATGTTGAAGCCCTCTTG  
TTGAAACATACGCCAATGATGACCCGTTTACGACAGGTGCCGCTGCCACCGCAACAGCCGCC  
AGAAGGGCTTTTAATGGCTGGCACCGCCGCCAACC CGGCCAGCGGACCAGTTTCTCACG  
GGTCGGATAACGCCCGGCCAGGGCGATCTCCCCTTCCACCAAGATCAGCGGCAATGCTTC  
GGCACCGGAACGATCCAAAACTGTTTACCACCGAATTGTGGACAAAGGCCATGGGTTC  
CTGGCTGAGGTTATAGCGTACCAGATCGATTTCTTGCCCTTTCGCCCAGTCCGCGTCAGC  
AGAAAAGCGTACCAGTGCAGGATCTATGGTCGGACCGCATAACGCCCGTACTGCAGCACAT  
GGCGGGATCATAAACACGGATTTTGGTCATGATAAAGTCTCCTGAAAGGATGGGTGCCGT  
CTGAAAAGTTACTGTTACCGATGCGCGCCAGTTTCGGCTTGAAGGGCCACGTCGCCACTG  
GCTTCCCCTGTTGTCAGGGCAGGGCCAGAAAGGCTTCGATCCGACGACGCAGGATCTGG  
TAGGCGGTGGTGAAGGCCGCTTCGATCTCTGCCTCGCTACCTGTTGCCTTGGCGGGATCT  
TCCACGCCCCAATGGGCGCGGATCGCTGGTCCCAGATACGCCGGGCAGGTCTCGCCGGCG  
GCGCTGGCGCAGACGGTAATGACGATGTCCGGAGTGATGGTGAGGTATCCCAGGACTTG  
CTACTGAGCCCTTCAGTAGAAAAACCTCTTGCTGCAGCAAGGCCAGCGACCGGGGATGG  
ACGTACCCGGCGGGATGGCTGCCCCGCACTGACTGCGTGATGGCCGGTCCGGCCAAGGCA  
TTGAAGATGACCTCGGCGAGAATGGAGCGGCAGGAGTTGCCGGTGCGAGAGGAACAAAATT  
TCCGGTTTTTTTCATGGCAGATTTCTTGGTGGGACGATAGGCGATGTGGATACTTCAGTAC  
GCGTTATGGCGCATTCCTGAGTACCGCGGCAGCAATTTTCGGTGAGATAGGCCACTAAAG  
CGCGAACTACAGGCATGGCCGCGCGATAGCGTTGGTAGCGGCCCTCCCGCTGCACCGTGA  
TCAGTCTGCGATGCTGCAGTGAATTTGAGATGAAAAGAGATGCTGTTGTGCGCCTGGCCCA  
GATGCTCGGCAATCTCACCAGACACCAGGCCTGCGGGTTCTTGCTCCACCAGGAGCCGGA  
AAATATCCAGCCGACCCGGCGACGCAAGTGCCTCCAGGCAGATCACGATCTGATCCCTTT  
GTTCTGTCGTGTCATAAGCCAACTCCCAAATTTTCGTTGAAGTATTGACAAGAACCAGT  
CGCTCGTCAAGACTACGAGCCAAATCTTCTGCGGAGTAACCGATCCATGCTGGCGGTACT  
GATCTTTCTGGCAACGTTGATATTGGTGATCTGGCAACCCAAGGGGTGAGTATCGGTTG  
GAGTGCCATGGGCGGTGCGGTACTGGCGCTGGCGACTGGCGTCATCACCTGGAGTGATAT  
CCCCGTGGTCTGGCACATCATCTGGGATGCCACTTTTACCTTTGTGGCGCTCATCATCAT  
CTCGCTGATTCTGGATGAAGCGGGCTTTTTCCACTGGGCGGCGCTGCACGTGGCGCGCTG  
GGGCGGCGGGCGGGGGCGACTCCTGTTCCCGCTGATAGTCATCCTCGGGGCAACCATTGC  
TGCGGTCTTTGCCAATGATGGCGCAGCGCTGCTCCTGACCCCGATCGTGATGGCCATCCT  
GCTGCAACTGGAGTTCACCCCGGCGGCCACTTTTGCCTTTGTGATTGCGACGGGTTTTGT  
CGCCGACACCACAGCCTGCCGCTGATGATCTCTAATTTGGTCAATATTGTCAGCGCCAA  
TTATTTCAATATTTTCGTTTGATCGCTATGCCCTGGTGATGGTCCCAGTGGATCTGGTGGC  
GCTGGCGGCGACGCTGCTGGTGCTCTGGATCGCCTTCCGGCGGGTGCTACCGCAGCATTA  
CGGCACTGCGCATCTCCCGGAACCGGCAACGGCGATCAGGGACCACCTGGTGTTTCGCGC  
CAGTTTCCCGGTGCTGATTTTGTGCTCATCGCTATTTTCGTCAGTGCAGTGGCAGGT  
ACCCGTCTCTGCGGTACCGTTACGGGTGCCGTGATTCTGCTCGCCCTGGCGGGCGCTG  
GTTTCAGGGTGGGCGCGGCGCGCAGATTTCCGTACGTAAGGTTTTGCAGGATGCGCCCTG  
GAAAATTGTGGTTTTTTCAGTCTGGGCATGTACCTGGTGGTATATGGGTGCGCAATGCCGG  
ACTGACGGAATATGTGGCCCAGGCCCTGCACTGGTTTTGGCACCCATGGGCCGGTCCGCCG  
CGCACTGGGTACGGGTTTTTCTGGCGGCGTTGCTCTCATCGATGATGAATAACATGCCGGC  
GGTGCTGGTGGGCGCGCTGGCTATCCATCACGCGTCTGCCGAGCGGACCCCATGGTTCG  
CGAGATTATGGTCTATGCCAATATCATCGGTTGTGATCTGGGTCCCAAGGTTACCCCAT  
TGGCAGTCTCGCCACCTTGTGTGGCTGCATGTGCTGGGTGCGAAGGGGGTACCATCAC  
CTGGGGCCAATATATGAAGACCGGACTGCTGATCACACCACCGGTGCTTTTGGTGACTCT  
GCTGGCACTCGCCTGGTGGTTGCCACTGGCTTGAAAAAACCTTTCCCATCCTCATGTAG  
CATGACATGGAGATGTTGGCCCTATAGGGGTCCCTTGAGAATTCGGAATTTCAAAGTACG  
CTAAGCGACAGGACCCTGGTTCTGTTCTGAAACTGTCCGAAACGGTTCCATTTTGGATGG  
GAGATAAACGGTGTACGAAAGAATGAAAACAGCATTCTGGACACGCGCCACTATTCTGA  
CACCATTTTCGGTCTGTGGTAGGCACAGCGTAAAGCTGGGTGAGTTTAAACAAACGGCTCT



AAAGTCCCACAGGATTTACAAGATTTAGTAGGCATCCACAGCCCCAAACCCGCCAGAACC  
CATCGCTTCGCGCTATTCTTGTGTCCAGTGTGGTATACCCTGTAGAGACGCCTGTCTT  
GAGACACTTTTCTGCCTCATTGATGTTGCTTTTCCCTATCTGGGGTCCAGTGAGAATTCG  
GAATATAAAACCCGTTAAGGATTGCTCAATGCAGCACTGGCGGGCGTTTCCCCTCATAC  
TTCATCAGAGTTCGCGCTTTTGTCTCTCGAAACCCATTGCCGACGGTGCCAGGGCTGCG  
AGAGCGGGTATCGAGAAAGGCGATGGCATTGTTTGCAGGACAATATTCTCGTTTCCGGTA  
GCTTCTGAAAAACGACCGTTTGCAGAAAGCCAGACGCTACCTGAGGTTTACCGTACTCTG  
CAATCCGAATTCTGAGGAGGGGGCATGCATGGCCAAGGGCTGCCTCCTAGTCTCGGTCTT  
GGCTGGGGCCAAACAGTACGGCCTGCCCCTACCCTCAGCCGGCTTAACGGGTTTTATATT  
CCGAATTCTCACGGGACCCCTATCTGCAACAGACTGCTCCTGTGAATAGTCCGATGCTGC  
TAACAGCTCAGCCATGGTATAGCGCCCCCGCGCTTTCCGTTTCGACCACGAGCCGCCGCTT  
ATCCACCACCAGACCGACGGTTTCCCCTGCAGACAGGTGTAAGACATCCAAGAGTGCCGG  
GGGGACGGCCAGCATGACGGAACCGCCCACTTTACGGAGATGACTCGTATACATGATAG  
AACGCTCCTCTTGAATTATATCTAAATATAACTCACAAAGCCAAACTCATCCAGGCCCCC  
AGTCATCATCGGGTTCACGGCACTTCCCTTTACCGGGCTTCGGCATGCTGATTGGCTTGA  
ACGGCAACGGTTTCCGCAATCCGCTTACTTCTTCCCTTTCGTGCGCTTCCCCTCCG  
CATTCTTCTGCGCAGCCTGTGCCAACGCTGAATCCGAGATCGAAAACCTCGCTTCAATG  
CGGTGTGCGCATTTTTAGGCGGAAGTCGTCCGAGCCCTCGATCATTAACCTCCGTCCAGC  
CCTTGGCTTTCGCCAACTCCAGCATAAGCGGAATATCCCTACTACCAGACTCCGCTTCA  
CAATGGCGCCCCGTATCAATGATCTCCCTGCCCTGATTATCCCTGACATTCAGTCCACCCA  
GGTCAGGACGCATCCGAATATACCAATTCTGCTCAACGGCCCCGCTCTGCGGTTGCCATCC  
CATAGCGCTCTGCCAGCGTTTTTTCCC GCCACGCCTGCCACGGCGTCTTTTTCTCCCCC  
GCACCGCTACAGCGTCCGCTACCATGGGTGCCACGGTTCCGTGGTGCGCCAGGAGCGCT  
GTGCGGCATCGACGTCATTTCGCTCCCCGCCGCTCCTGCAGCGCGGCTTTGACCGTCGCT  
GCGCTTCCGGCAGATCATTTCGGCGGGTAGACCCAGATCCGGCGACCGTACTCTCCCCCT  
GACCATCGGGGACGCGGCGCTCGACCTGTTTCATATCCTGCTTGGCGGTACGCCTGACCCA  
CATCCAAGTCGTTTTGGGTCCGCAACTGCTCGGCCAATGCCAATAACCCCTCTGGCGGG  
CCTTCCCTGGCGGCATCGGCGGCCTGACGCTCCCGCTCCAGCCGCAGATCCCGCGCCGCT  
GTATCCGCAAAAGACGCGCAGGGGCCTCCCGGAGACGGGTTTCCC GCCGGGCAATCTCCG  
CCGCTTCCCCTCCGCCGCCCGCCGGGCTTCAATGACGGCCTGGCGCTCGGCCTTGGCCG  
CCTCGAAATCCACCACCATCGCCGCCGCTCCGGTGCATTCTCTAACCCGGCATGGGTCA  
GCACCCGCCCTTTCTTCGGCTCCGGGGGACGGTCGAGGGCGTCAGCTTATCCGCGAACT  
GCCGCGCCAGATCGGATCTTCTTCCCTCCACCGTGGCGGACATATCCAGATATGCTTCGC  
GTTGCGCTTCCAGCGTGCGATGGTGCATCCGGGCATCCACGCCCGCTGCTCCAGCGCTT  
CGTTGGCCAGCCCCTCCCAGAGAGGACGCACACGGTCGGTCCAGGTGGATGCGGGCACTA  
CCTGGTCATCAACGTCCTTGTGGCCGGGTATCGGCAGGCGCTCGCGGGTCTTTTCGCGCTC  
CGGGCACCTTGGCATTGGGCTGCCTGAACAGCGTCTCGGCATCACGCTCCACGCCATCCA  
TGATGCGGTTCGGATAGCAGGATATGGACGTGCCGATGCTCGGGGTGGGCGGCGTCTGCT  
GGTGTATCGCCAGCGTGTACGGCGTGACCCCGCCATCCACCGTGGCGACTTCTTGAGCAA  
AAACCCCGCGCCAGCGCTATTTGCTGCTCTTGGGTCAATTCCTCGGGGAGCGCGACTTCTA  
CCTCTCGATAGGTGCAGCCGTTTCGCCCCGCTCGTGGGCATCGCTGGCGTCCCAGAAACGGG  
CGGGGTCCGCTGCGGCCAGGCGGGCAGGTTGCCGGATTTCGGCATGAACGAGTTCGGCGC  
GCTTGTGATGACGATCTCCCGTACCGTGGCCCCATCCTGCTCCCGCTCCCGGACCTTCG  
CATAGCACCTTCCCAGCAAAATAACGCGCCTTGCTCCGGCACCTTGGCGCTGCTCT  
TGCTGCCACTGCTGACGTGCAGGTGATAAATCGCCATACGCTCTCCGGGGTGCATGGGCG  
CAGCCCTTGGCGTGCTCATGTCCGTAGGACATGATTAAGCGCGCCTGCTTTACAGGATAC  
GGCAGGACGGCTCCTTGTGTGTAGGCATAACACATTTCGGTTAGCATGCCGCAATAGGGC  
GGATATGGGGGTCTCATGGCAGCGGCTATCGAAGAACGCATGGCGCGCTGGCGGCACGG  
AAAGAGGCGGCTCTGGAAGGCAAGGCCGCCGATGCGCGACTGCGCAAGCTCCGGGCG  
GAACAGGACCGCATGGCGCGAATCTCCGCCCGCAAGGAGCGCAACAAGGCGCTGATTAG  
GCGGGCCTCCTGGTGGAGATGACGAGCCTCCTGTCCCTGGACCGGGGAACCTCCTGGGC  
GGGTTGCTGGCCTTGGCCAGGAGCGCCGAGGGGAACCCGAGAAGGCAGCACAAATGGA  
CAGGCGGGGACGCGGAGATCACCCGGCGGGAAACAGAGAAGGCCAAAAAAGACAGAA  
CCGAAGGAACCCGCGCTGGACGGATTTCAGTCCGGCTCCGCTGGGCGCCGCCCTCCGACG  
ACAACATCCCGCGCAATCGCGCCATGACCGCCTCCAGCGCCTGCCGCTCTCCCGCCATGA  
CCGCCCGTTCTGAACCAGGGCTTCTTCCGCTCTTTGGCCCGTGCTTCCGCCGCCCGCG

CACGGGCTTCCGTGCAATCCACCTGCTCCGCCATTTTCAGCCAGATCGGAGAGCGCCGTCT  
CCAGACCCTCGGCCAGGGTCCGGCTCTCCGTGCGAACTGCGCCAACAGCGCGGCGTGTC  
TCCGCTCGGCCATCGCCCAGGCCGCCGACCAGACCGCTGGAAGGCCCTGTGAGGTCGC  
TGGGCATGGCGGGGGCGCTCTCCAGGTCTCCGGCATCGCCGGAGCGCTCTCGGCGTCCC  
GGATGGCCTGCAGGTGCTTCTGAATGGTCGCCAGGCTCCCCCGTCCGATCCGTGCGCGAA  
TCGCCGCCGCGTTGGTGCGGTTCCGGGCCGCCAGGGCCTCGACCGCCGACCGGACGTCAT  
CGGCGGTGATGGGACCAGCGGGAACCGGCGGTACGATGGCCTCGTCCATGATTGTCTCCT  
CTACCGTGTAATTTACGATGTAAACGTATTATATGTAAATTACAGAGAGAAGTAAAATAT  
TTTTACACAGTGCCACCGACCTTGGCGGACATCCAGAGGGGTTCGGCGGCGCAGCAGGAT  
TACCAAGCGCCGAAGGGGTTCGGCGGCGTTGAGGACGGAGCGCGCCCTTCCCTTGGGGTC  
GCTGTAGAAAACGGAATTTAAAGCACGGTAAGCCGCTGACTGGTTGCGACTCTCGTAAAC  
GATCGTTTTTTGAGAGGGTGCCGTGAGAAAGCAGGCCGCGCCAGTGCTGGCCTGGCTTGTC  
CTATTCTCGAAAACCGCTCTTGTATCTGGCCGCACGGACTGACGAGTTTCGAGAACAGCC  
GGAACACCACCTTAAGCGGCAACCGCCACCCGCAAAGCCGCACCGGTGCTGGATCGAGTA  
TTTCTTACCGTGCTTTAAATTCGGTTTTCTACAGCGACCCCTTCCCTTGCAGAGGCCAG  
ACGCTAGGACTGCTGGTGGAGATCGGGAGACGGCAGGGGCTCGTAATGCGTGTTGAACAC  
GTTTCGGAATGAATAACCGCCAAACCGCCCTGGTGACACGGGTACACCCGCCCGCCGCTCA  
GGAAAGCCCCGCCAAGGCCCAAATCTGCCCTACAGCGCACACAATGGGTATTGGTGGTA  
GGGTGTCCCTACCCCAAGCGCCAGAAAGGCGATTTACGCGCCCGCAATGCCCATTCATC  
GCGACGGCGCCGCACAGACCCCGAAGGAGTGCCCGCTTGCCACGCCTTCGGCGTGCCGGG  
CACGGATTGCTTTCCGGCCATGCAAACCTCGCGTAGTACTCCGTAGCAGGCATTCCGCC  
CTCTGGGCGGTTGCGGTAGCGTCAACGATTTGCAAGCAAATCGCCCCGCCACTCCTCGCT  
GTACTTTGCGCCTGCGGCGCTAGAGCAAAAAGCTCTTTTCAAAAAAAGCCTGATTCACTGC  
TAAACCGAAAGGGGGGAGCCGCTGCCGAAGGCAGTGGGGGACAAAGTCCCCAAAGGGGGT  
CGATCCGGCGAGGCGAAGCCGAGGACAGGGGGACCAGCAGGGTCCCCGCCGAAATGTTT  
GTGGGCGGCACTGCGAAGCCGTGGCAAGCGCCCACTCCTTGTCGATGTGGCCGAGGTGAT  
TTCCATTTCGTGCCACCGGCACAGTGACGGCCCGCAAGGAGGCCCCATAGAACATAGAAAG  
GGATTTTTTTTCAATATACTGATTTCTATGATTTTTTTTTTGGGGGGTGGGGTCATAGCTGA  
TGACCCACCTAGGGTCATAGCTGATGACCCCGGTTGTGAAAAAGTGAGCATTATTTTTTC  
CTTTGCTCTGTGGAAAATCACACAGACTTGATGTAAATGTCTACTCATTGCCCCACCT  
AAGGTCATGTATGGAGTCCACATCTGCCAAGATAGGTACACCAGCCAAAAATAAAGTTGG  
TCAGTGGGTTCAAACCGAACGCAAAGCGCATGAAGCTTGGGCAAATCTGATCGGTGCGAA  
ACCTCGTGACGAATGCTGCTACATCATCTGGTGGCTCAGATGGGCCACCAGAACGCGGT  
TGTCGTGCCTCAAAAAGTTTTGGCGAAGCTGATGAAGTGACGCCAAGAGACTGTAAACG  
TGCAGTAGCCGATCTTGTTGCGGAACGATGGGTACAGGTCGTAAAACTCAATGGTCCTGG  
TACGGTCAACGCGTATGTGGTTAATGACCGAGTAGCATGGGGTCAACCTCGTGACCAATT  
GAGGCTGTCTGCCTTTTTCGGCAACTGTGGTTGCCGACCATGACGATCAAGATCTCACCAC  
CCTCGACCATAACAGACCTGCGCCGTATCCCGACCTTTATCCAGGCGAACAACAATTGCC  
ATCAGGGCCACACGAGGACCCGCCAGCCAGCCGTGCCGCGACATGGAACCAGATTT  
GCCGTTCCCTGAGGCTCAGGAAACAGACTTACAGGGCAGACTGGAGGCCGATGGCCAAGG  
GCGTCTTATCGACTAAGCACAAAGCCGAGACTCACCAGGCTATCCCCAGAATCGCCACCAA  
GGGCGTGGCGATGGTGCTCTCTGATCGGTACGACCGCCTGCGCCCGCTCAAGCTGCTGA  
CGTAGCCATACCTCCCTCTCCTTGGCCTCACTCAACTGCTCCTTGAGCGTCTCTATAATC  
TCCTCTCTTGCTCAATATAGGCCTGTAACTCACTGTTTCAAGGAGACACTTATCTATTGTC  
TCCTCTTGACATTTTTCGCTCGTTTCTGATGTCGCCTGTAGAACACCAAAAACCCGAATG  
ATCTCCGCGTATCTATCATCGGTGCGCCTTGGTGATCTCTATCAACGCTTATTTTTCCG  
GTTGAAATATACCCTCTATAGAGCTGCTGGCGACCCACTCCGGCCAGCCTTGCCGCCTCT  
GTAACACTGACTTTTGCCATAGTCTCCTGTTGTAACCTTTAGTGTCGCGTCATGTCCGAA  
CCTATATAGTAGGATGTTCTGCTAGAAAATGTAGTATGTGGTTAGGATACGGAGGGAGT  
CTGCTTGCCCAAGATAAGCGGTTTTACGGGATGATCATCAAAATGTTTTTCGATGATCA  
TAGTCCGGCCCATTTTTCATGTTTCACTACGCGGAGTTCAAGGCCGTGATCGCTATAGAATC  
CCTGTCCGTGATAAGAGGCCATCTGCCGCGTCGCGCTCAGGAGCTCGTTCTCGACTGGAC  
CGAGCTGCATCAGCAGGAACTTTTGGAAGATTGGGCCTTATGCCAGGCGAAGCAGCAACC  
CAAGCCGATAGAGCCTTTACTGTAGGAGATACGCATCATGGAATGGGATGTGGTAGAGGT  
CCACACAGAGTCGCCATTAGCGCTGAACGTGCGCTTTGCCGACGGAACACAAGGACAGGT  
GCGCTTTGAGCCAAGCCATCTAACGGGTGTTTTGCCCCGTTGAAAGACCCCGCGATGTT

CAGCCAGGTACATATCGATCATGGCGCTTTAACGTGGCCAGGTGACGTAGACCTCGCACC  
TGATGCCATGTATGACGCTATCAAGACGCATGGGGAATGGGTGCTCAGCTAAAATGGGCG  
GCCTCACC GTTTTGTCTCAAAACAGCCAGCCCCAGGCACCCGGAGACCCCGGCAAAGTCA  
GGCCATCCGTCCAGCCGTGGGGCAGCCACGAGACAGAACGACGCAAAAGGTCTGATCCA  
AGCAGGTAGAAGCTCGAACCCAGATTATTCGGCTTACGACCCTTTTCAGGAAGGCCTA  
CCAGGCCGTATCCGGTGATCGCTTTCCAGCAGATCGGGGCCGAGGCTCTTCAAAACCT  
GATCCCGATCGAAACCACCAGTCCGGGATTGATAAATCATCATCTCTGTAGGCTCCGCCC  
CATACTAGAATGTGAAAACCGTCCTCAACATTATCAAGCCTCTCCGCATGAGCGCCATAA  
GTGGTGAGCAGGACTCCGCCCCGTCCAGGCTCTTCATAGCCGTGAGACTCGTGGCAACAC  
CACGCCAAAATCGGTGTGTCTTTGGGCGCGGTTTTCCATTGACTGAAAACCATGTACAGCC  
AGCCGCTTACAAATCTCATGTGGTGGCAGATTTCGCTAACTTGTCTAACTGAATCATAAAA  
ACCCTATAGTGGCCCCGTGTTTTTCAGACAGCAGTGTAAGCTATTTTTTGGGCCACTCAGAA  
TTCGGAATTCTGAGGGGACCCCAAATTCACCCATAGATGCGCTTCGATCAAGCTTTTTCT  
CGATCCAGCGTCCGCCCCACGCACTTCAGGCCAAGTCCGCTTCGCCGCTTCCATCCATGCC  
ATGGCGGCGGCCTGCACTGGATCCCAGGGGCTGCTGAACGGCGGCGGTGTAGCTGAGGTCG  
AGATCATTAGATCTTCGACGCCCATCCCGTGGAAAAGCGCCGTTGCGAATATGTGATG  
CGTTTCGACACCCCCGACTGCCAGTGGCCGAGGATCTGCGCGCCTAGGAGTCGGTCGGTC  
CGGCGATCGCCGTCACCCGGATGCGCAGTTTCTGTGCATCCGGGTAGTAGGCCTTGTGA  
TCCCAGGTTTGC GTTTTCGACGGTAATGGGATCAAATCCCGCAACGCGCGCTTCTGGTTCG  
CGAAGCCCGTCCGCGCGATCGCCAACTCAAAGACTTTGACCGTCTGAGTGCCGACCGAA  
CCCCCGAAGAGGCGTTCCCCGCCCCTGCGTTCTCGCCAGCTACACGTCCTTGCTTGTGT  
GCGGTCTGTGCCGAGCGGCAGATACGCTGGCCGTTGCAGTATCCGGTGCCAAGTCTCTGCA  
CAGTCGCCGGCAGCCCAGATGCCCCGGTATCCCTGTCTCCATGCGTTGGGTGACGCGAATC  
GCGCCCGATGGGCCAAGTGGGATCCCCGCAGCGGTGGCAAGATCGGTGTCCGGTTCGCACG  
CCAGTGGCGACCAGCACCAAGTCGGCCGAACCGGCAAACCCGCCCCGTGCCCGATACTGCG  
AGGCTGTGCGAGCTATCGGCTTCGATTTCGTTCCACAGTGCAGCCGCCACGATGCACACA  
CCATGCCGTGCCAATTCTCCCCGATCAGCTTGCCGAACCCCGGATCGACGGTCGGGAAC  
ACGGGATCGGTATGACTCACGAGCGTGACCTCGATTCTCGATGCCGTAATGCGTCGGCC  
ATCTCGACACCGATATAGCCCGCACCAACAATAATGACGGAGCGCGCCCCGCGTTCCGTG  
AGATGATTCTGGACCGCAAAGCCATCCGCCATGGTATGCAAAAATAACACGCCGGGGAGG  
TTGAGGCCAAGCAAGCCTTTGGGGCAGGATGGCACGGCGCCGGTCGCCATCACCAGATGG  
TCGTAGCGCAACCTCCGCATGCTGCCATTGGGTCCGCGGACCACCTCAACCGTCTTGCC  
ACTGGATGAACGGCCACGGCGCGATGATTCGTGAGGATTTTCGATGCCCTCGAACGCGGTG  
CGATGGGCGAGCTGCCGGTGATCCGGCGTCTCGCCGCTGAGATAAAAAGGCAGCCCGCAG  
ATGCTGTAGTTCCGGTACTCGTCGGTCAGCAGAACCGATACCTCTGCGGAAGTATCCTTC  
TCGCGCGCCCCGGAGCGCCGCGTGTATGCCGGCGTCGCTACCGCCGATGACGAGAAGGCGG  
ATCATGGCACGGCCCTTCGCGGCAGGGACATCCCCGGTCGGTGATTGCGGGGAGACGGGC  
TCATTTCTCACCGGCCTTCAAAGGATTAGCCCCCTTCCTGGGGGTGCTTGGCTACCCACTT  
CAGGAGGTCTGTACGGGATAGCATGCCGACCACCCGGTCGTTTTGCAAGACCGGGAGGGA  
TACGATATCGAAGTCTACCAGCAACCGGGCTGCCATGACGATATCCGTGTCCGGCTCCAC  
GCTATGGACGTCGCGCGTCATCACCTCCATGGCGGTGCGACCCTGGTCTTTGTGCGGTTC  
CTCTGGGTGCCCGCGGAAGACGGATTTGTAGAAGTTTTCTTTCAAATCGACGTGCGGGG  
ACCCAGCGTCTCGTCGGCGGCGCGATAAATGAGATCCGCCCGCGTGATGCCCAGCAT  
CCGTCCCTCCCAGTCGATTACCGGTACACCGTTGATTCCGTGTTCCAGCAGTATCTGGGC  
GATCTCCTCCACCGGAGTCTGCGGCGCGACGGTAATAGGATCCC